

# **Flavin-abhängige Monooxygenasen aus *N*-oxygenierenden Arctiiden**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sven Sehlmeier  
aus Cuxhaven

1. Referent: Professor Dr. Dietrich Ober  
2. Referent: Professor em. Dr. Thomas Hartmann  
eingereicht am: 30.09.2009  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 04.01.2010  
Druckjahr 2010

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Tagungsbeiträge**

Sehlmeyer, S., Mohagheghi, H., Hartmann, T., Ober, D.: Molecular evolution of Senecionin-*N*-oxygenase (SNO) of Arctiid larvae (Lepidoptera). (Poster)  
Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Braunschweig  
(05. - 10.09.2004).

Sehlmeyer, S., Ober, D.: Molekulare Mechanismen der Verteidigung von Arctiiden (Lepidopteren) durch Pyrrolizidinalkaloide (PAs) pflanzlichen Ursprungs. (Vortrag)  
Doktorandenworkshop der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Sektion pflanzliche Sekundärstoffe, Kaub (2005).



## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dietrich Ober für das interessante Thema, sein stets offenes Ohr und für die vielen Tipps und konstruktiven Ideen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Hartmann für die Bereitstellung der "Amerikaner", sein stetes Interesse und für die aufschlussreichen Gespräche.

Herrn Klaas Vrieling für seine Gastfreundschaft und Hilfsbereitschaft bei meinem Aufenthalt in Leiden/Niederlande.

Claudine Theuring und Ingo Naberhaus für die Unterstützung des blutigen Teils der Materialgewinnung aus *T. jacobaeae*. Claudine Theuring danke ich dafür, dass Pyrrolizidinalkaloide zwar nicht auf Bäumen wachsen aber mir trotzdem zur Verfügung standen.

Inis Winde für Ihre Unterstützung besonders bei der Vervollständigung der *Grammia*-Sequenz und dem daraus abgeleiteten Expressionsklon.

Meiner Vorgängerin Claudia Naumann für die Einarbeitung und die schon fertigen Materialien.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Pharmazeutische Biologie Braunschweig für das freundschaftliche Arbeitsklima.

Tania Meßerschmidt für die Kryokonservierung der Insektenzellen.

Meinen Eltern für die Möglichkeiten, die mir unter schwierigen Bedingungen trotzdem geschaffen wurden. Einen besonderen Dank an meine Frau auch wenn es "mal" etwas länger gedauert hat.



## Inhalt

1 Einleitung .....	1
1.1 Pflanzliche Sekundärstoffe.....	1
1.2 Pyrrolizidinalkaloide (PAs) .....	2
1.3 Strategien der Anpassung von Insekten an Pyrrolizidinalkaloide.....	5
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Chemikalien.....	8
2.1.1 Antibiotika.....	8
2.1.2 Gelelektrophoresen.....	8
2.1.3 Western-Blotting.....	8
2.1.4 Dialyse und Proteinfaltung.....	9
2.1.5 Aktivitätsbestimmungen.....	9
2.1.6 Enzyme.....	9
2.1.7 Medien und Zusätze.....	9
2.1.8 Sonstiges.....	10
2.2 Eingesetzte Kits.....	10
2.3 Vektoren.....	11
2.4 Primer.....	12
2.5 Organismen .....	14
2.5.1 Lepidopteren.....	14
2.5.1.1 Haltung und Fütterung .....	15
2.5.2 E. coli.....	16
2.5.2.1 E. coli-Stämme.....	16
2.5.2.2 Anzucht der E. coli -Zellen.....	17
2.5.3 Insektenzellen.....	18
2.5.3.1 Quantitative Bestimmung der Sf9-Zellen .....	18
2.5.3.2 Kulturhaltung.....	19
2.5.3.3 Kryokonservierung von Insektenzellen.....	20
2.6 Molekularbiologische Methoden.....	20
2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese .....	20
2.6.2 Nukleinsäure - Isolierung .....	21
2.6.3 cDNA-Synthese .....	22
2.6.4 PCR-Methoden .....	22
2.6.4.1 Polymerase Kettenreaktion .....	22
2.6.4.2 Sequenzsuche mit degenerierten Primern.....	24
2.6.4.3 Schnelle Amplifizierung von cDNA Enden (RACE).....	24
2.6.4.4 RT-PCR .....	25
2.6.5 TOPO-TA-Cloning.....	26
2.6.6 Restriktionen.....	26
2.6.7 Ligationen.....	27
2.6.8 Herstellung kompetenter Zellen.....	28
2.6.9 Transformation.....	28
2.6.10 Plasmidisolierung .....	29
2.6.11 Sequenzanalyse .....	29
2.7 Heterologe Genexpression in Insektenzellen.....	31
2.7.1 Im Insektenzellsystem eingesetzte Klonierungskonstrukte.....	31
2.7.2 Virustiterbestimmung.....	31

2.7.3 Expressionsscreening und transiente Expression .....	32
2.7.4 Transfektion von Insektenzellen für die konstitutive Expression.....	34
2.7.5 Konstitutive Proteinexpression mit Sf9-Zellen.....	34
2.8 Heterologe Genexpression im E. coli System.....	36
2.8.1 Expression .....	36
2.8.2 Expression mit pH-modifizierten LB-Medien.....	36
2.8.3 Expression nach unspezifischer Induktion von Chaperonen .....	37
2.8.4 Aufschlussverfahren.....	37
2.9 Biochemische Methoden.....	38
2.9.1 Konzentrierung und Umpuffern von Proteinproben.....	38
2.9.2 Proteinfällungen.....	39
2.9.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford.....	39
2.9.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.9.5 Färbung von SDS-Elektrophoresegelen .....	41
2.9.6 Blotten von SDS-Elektrophoresegelen .....	42
2.9.7 Indian Ink Färbung von Blotmembranen.....	42
2.9.8 Westernblot .....	43
2.9.9 Solubilisierung der Inclusion Bodies (IB).....	44
2.9.10 Renaturierung von solubilisierten Proteinen.....	45
2.9.11 Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine.....	46
2.10 Aktivitätsbestimmungen.....	47
2.10.1 Qualitative Aktivitätsbestimmung mit radioaktiv markiertem Senecionin.....	47
2.10.2 Optischer Aktivitätstest.....	48
2.10.3 Radioaktiver Unterfütterungstest.....	49
3 Ergebnisse.....	50
3.1 N-oxygenierende Arctiiden .....	50
3.1.1 Arctiinae.....	51
3.1.2 Lithosiinae .....	52
3.2 Etablierung eines radioaktiven Unterfütterungstestes .....	53
3.3 Molekulare Isolierung und Charakterisierung von Flavin-abhängigen Monooxygenasen in Arctiiden.....	55
3.3.1 Sequenzsuche mit der ersten Generation degenerierter Primer .....	55
3.3.2 Benennungsschlüssel für die Arctiiden FMOs und PNOs.....	58
3.3.3 FMO <i>Arctia caja</i> .....	59
3.3.4 FMO <i>Arctia villica</i> .....	64
3.3.5 PNO <i>Grammia geneura</i> .....	68
3.3.6 Konstruktion der zweiten Generation degenerierter Primer.....	73
3.3.7 PNO <i>Arctia caja</i> .....	76
3.3.8 PNO <i>Arctia villica</i> .....	81
3.3.9 PNO <i>Pericallia matronula</i> .....	84
3.3.10 Flavin-abhängige Monooxygenasen von <i>T. jacobaeae</i> .....	86
3.4 Eigenschaften der Arctiiden-FMOs .....	90
3.5 Expression der rekombinanten SNO von <i>T. jacobaeae</i> in Sf9-Zellen.....	92
3.5.1 Transiente Expression .....	92
3.5.2 Konstitutive Expression.....	96
3.6 Expression potentieller PNOs in E. coli.....	97
3.6.1 Strategien zur Vermeidung von Inclusion bodies .....	97
3.6.1.1 Expression der potentiellen PNO von <i>G. geneura</i> .....	97



---

3.6.1.2 Expression der potentiellen PNO von <i>A. caja</i> .....	100
3.6.1.3 Coexpression der potentiellen PNO von <i>G. geneura</i> und <i>A. caja</i> mit Chaperonen.....	101
3.6.2 Renaturierung der PNO von <i>G. geneura</i> aus Inclusion bodies.....	104
3.7 Gewebespezifische Expression der potentiellen PNO von <i>A. caja</i> .....	107
4 Diskussion.....	114
4.1 Nutzungsaspekte der PAs für angepasste Arctiiden.....	114
4.2 Funktion von Flavin-abhängigen Monooxygenasen .....	117
4.2.1 FMOs im Tierreich.....	117
4.2.2 FMOs und PNOs in Arctiiden.....	120
4.2.3 Phylogenie der Flavin-abhängigen Monooxygenasen .....	124
4.3 Adaptionsmechanismen von Lepidopteren an pflanzliche Sekundärstoffe .....	127
5 Ausblick.....	129
6 Zusammenfassung .....	131
7 Literaturverzeichnis.....	133



## Abkürzungen

abs.	absolut
<i>A. caja</i>	<i>Arctia caja</i> , Brauner Bär
<i>A. villica</i>	<i>Arctia villica</i> , Schwarzer Bär
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
BEVS	Baculovirus-Expressionvektorsystem
cDNA	copy-DNA
cpm	Counts per minute, Zählimpulse pro Minute
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> , Fruchtfliege
DC	Dünnschichtchromatographie
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DOC	Deoxycholat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. albicosta</i>	<i>Eilema albicosta</i> , Flechtenbär
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
FBS	Fetal Bovine Serum, Fötales Rinderserumalbumin
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenase
GSP	Genspezifischer Primer
HSS	Homospermidinsynthase
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB(-Medium)	Luria-Bertani
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	messenger-RNA
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamadenindinukleotid (reduzierte Form)
OD	Optische Dichte, Photometrische Absorptionsmessung
ORF	Open reading frame, offener Leserahmen
PA	Pyrrolizidinalkaloid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>P. matronula</i>	<i>Pericallia matronula</i> , Augsburger Bär
pfu	Plaque forming units (Plaque bildende Einheiten)
PNO	Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxygenase
PVDF-Membran	Polyvinilidendifluorid (Blotting Membran)
RNase	Ribonuklease
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SNO	Senecionin-N-Oxygenase
<i>T. jacobaeae</i>	<i>Tyria jacobaeae</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetra-methyl-ethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
% (v/v)	Volumenprozent
w/v	Massenkonzentration
% (w/w)	Massenprozent
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactopyranosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Pflanzliche Sekundärstoffe

Für das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen sind eine Vielzahl biochemischer Reaktionsgefüge nötig, die der Pflanze alle essentiellen Verbindungen liefern. Der Anabolismus und Katabolismus aller für Wachstum und Entwicklung notwendigen, körpereigenen Substanzen werden als Primärstoffwechsel zusammengefasst. Diese grundlegenden Reaktionsgefüge sind praktisch in allen Organismen verwirklicht und über die Organismengruppen hinweg hoch konserviert, da Veränderungen in aller Regel zu Funktionsstörungen führen, die häufig den Tod dieser Individuen nach sich ziehen.

Pflanzen sind einer Vielzahl von Fraßfeinden ausgesetzt, denen sie sich aufgrund ihrer sessilen Lebensweise nicht durch Flucht entziehen können. Deshalb mussten Pflanzen im Vergleich zu Tieren alternative Strategien zur Verteidigung entwickeln, um das Überleben der Art zu sichern. Einige dieser Abwehrmechanismen konnten durch die Umgestaltung des anatomischen Aufbaus entwickelt werden. So führte das Wachstum subepidermaler (Spross-) Gewebe und sukzessiver Verholzung zur Ausbildung von wehrhaften Stacheln, die auf einige Fraßfeinde eine abschreckende Wirkung haben. In der Abwehr von Mikroorganismen, Viren und Herbivoren entwickelten Pflanzen darüber hinaus noch eine Vielzahl von chemischen Verbindungen, die nicht ubiquitär auftreten und z. T. sogar artspezifisch sind. Diese als pflanzliche Sekundärstoffe bezeichneten Verbindungen leiten sich von Substanzen des Primärstoffwechsels ab. Sie werden in spezifischen Reaktionsfolgen zu biologisch aktiven Substanzen synthetisiert, die nicht essentiell für Wachstum und Entwicklung jedoch für das Überleben einer Art bedeutungsvoll sind.

Die biologische Funktion pflanzlicher Sekundärstoffe ist häufig nicht direkt zu erkennen. Vielmehr offenbart sich die Funktion erst im Wechselspiel mit schädigenden Organismen. So reagieren *Nicotiana*-Arten auf Fraßschäden verschiedener Insekten mit einer erhöhten Bildung von Nicotin. Dieses Alkaloid wird offenbar nach Induktion durch Schädigungen vermehrt gebildet und soll in höherer Konzentration weitere Fraßschäden unterbinden. Pflanzliche Sekundärstoffe fungieren somit oft als chemische Abwehr der Pflanzen. Aber auch Pflanzen, die über eine effektive chemische Abwehr verfügen, werden von einigen wenigen spezialisierten Herbivoren als Nahrungsressource genutzt. So können die Raupen von *Manduca sexta* auf *Nicotiana*-Arten fressen, ohne selbst geschädigt zu werden. Da Nicotin bei verschiedensten Organismen als Nervengift wirkt, muss *Manduca sexta* über Schutzmechanismen verfügen, die den Raupen eine sichere Nutzung erlauben.

Am Beispiel der Interaktion von *Nicotiana attenuata* und *Manduca sexta* lässt sich der wechselseitige Wettkampf von Pflanze und Fraßfeind erkennen (Kessler und Baldwin, 2002). *Manduca sexta* hat nicht nur Mechanismen entwickelt, *Nicotiana*-Arten als Nahrungsressource zu nutzen, sondern vielmehr gelernt die pflanzlichen Sekundärstoffe als chemische Abwehr gegen eigene Fraßfeinde einzusetzen. Sowohl die Nutzung von *Nicotiana*-Arten als Nahrung als auch die Verwendung der Alkaloide vom Nicotin-Typ als Fraßschutz basieren auf effektiven Exkretionsmechanismen. So konnte ein aktiver Transport von Nicotin in das Lumen der Malphigischen Gefäße nachgewiesen werden (Gaertner et al., 1998). Die Malphigischen Gefäße dienen in Analogie zu den Nieren der Säuger der Ausscheidung von Substanzen aus dem Blut. Ein anderer Exkretionsmechanismus führt dazu, dass die Alkaloide an die Insekten-Oberfläche

(Integument) abgegeben werden und eine äußere Schutzschicht bilden (Kessler und Baldwin, 2002). Im Gegenzug hat *Nicotiana attenuata* weitere Mechanismen entwickelt auch *Manduca sexta* abzuwehren. Ganz im Gegensatz zur Abwehr nicht angepasster Insekten wird die Nicotinsynthese verringert (Winz und Baldwin, 2001), um die Abwehrfähigkeit von *Manduca sexta* gegen Fraßfeinde herabzusetzen. Diese werden darüber hinaus noch durch pflanzliche Botenstoffe angelockt, deren Bildung nach Fraßschäden und Kontakt mit Fettsäure-Aminosäure-Konjugaten von *Manduca sexta* induziert werden (Halitschke et al., 2001). Für diese indirekte Abwehrstrategie wird *M. sexta* somit geradezu für Insektivoren chemisch markiert.

Aus der immensen Vielfalt pflanzlicher Sekundärstoffe sollen in dieser Arbeit die Anpassungsmechanismen von Insekten am Beispiel der Pyrrolizidinalkaloide exemplarisch untersucht werden. Bei dieser Gruppe der pflanzlichen Sekundärstoffe imponieren besonders die vielfältigen Mechanismen, die bei den angepassten Insekten entwickelt wurden, um die Pyrrolizidinalkaloide nicht nur physiologisch sicher zu handhaben sondern aus ihnen selbst eine chemische Verteidigung aufzubauen. Insekten, die an die Nutzung von pyrrolizidinalkaloidhaltigen Pflanzen angepasst sind, erweisen sich deshalb als besonders geeignet das evolutionäre Wechselspiel zwischen Pflanzen mit chemischer Abwehr und Anpassungsmechanismen der Herbivoren zu untersuchen.

## 1.2 Pyrrolizidinalkaloide (PAs)

Die Verbreitung der Pyrrolizidinalkaloide (PAs) innerhalb des Pflanzenreiches erstreckt sich auf nur wenige Taxa der Angiospermen, in denen der Großteil aller bekannten pyrrolizidinalkaloidhaltigen Pflanzen auftreten. So können ca. 95 % aller PA-haltigen Pflanzen den Familien der Asteraceae (Senecioneae und Eupatorieae), den Boraginaceae, den Apocynaceae und den Fabaceae (vorwiegend in der Gattung *Crotalaria*) zugeordnet werden. Die Orchidaceae weisen in nur wenigen Gattungen pyrrolizidinalkaloidhaltige Arten auf. In wenigen weiteren Familien wie den Ranunculaceae können vereinzelt PA-haltige Arten nachgewiesen werden (Hartmann und Witte, 1995).

Pyrrolizidinalkaloide sind Esteralkaloide, die aus einem Basengrundkörper, der Necinbase, und einem veresterten Säureanteil, den Necinsäuren, aufgebaut sind. Die Necinbase besteht aus dem bizyklischen Pyrrolizidin-Grundkörper, der mit einer oder mit mehreren Necinsäuren (an den Positionen 7 und/oder 9) verestert ist. Durch Art und Anzahl der Necinsäuren bzw. Veresterungen ergeben sich Monoester, offenkettige Diester, makrozyklische Diester und makrozyklische Triester, die als charakteristische Merkmale einer systematischen Gliederung der Pyrrolizidinalkaloide zugrunde gelegt wurden (Hartmann und Witte, 1995). Durch spezifische Derivatisierungen wie Hydroxylierungen, Epoxidierungen und Dehydratisierungen eines Pyrrolizidinalkaloidgrundkörpers (in Arten der Gattung *Senecio* ist dies das Senecionin) entsteht das für eine Art bzw. für eine chemischen Rasse spezifische Alkaloidbouquet. Die resultierende Strukturvielfalt der PAs bietet den Pflanzen ein äußerst flexibles Abwehrsystem, welches die Anpassung an unterschiedlichste Umweltbedingungen ermöglicht.

Die Biosynthese der Pyrrolizidinalkaloide fußt wie bei anderen Alkaloiden auf Substanzen des Primärstoffwechsels (Aminosäure-, Polyaminstoffwechsel), die in spezifischen Metabolisierungen zu pflanzlichen Sekundärstoffen synthetisiert werden. So leiten sich die Necinsäuren der PAs vor allem von den verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Isoleucin ab. Nur in wenigen Fällen dient auch Leucin als Edukt für die Biosynthese der Necinsäuren. Die Entlehnung von Metaboliten des

Primärstoffwechsels für die Synthese von pflanzlichen Sekundärstoffen wird in Pflanzen an definierten Schnittpunkten durch spezifische Enzyme vollzogen, die als erste Enzyme von sukzessiven Reaktionsketten des Sekundärstoffwechsels spezifischen Regulationsmechanismen unterliegen. So wird die Aktivität der Putrescin-*N*-Methyltransferase (PMT) durch Ethylen, welches nach Fraßschädigung von *Manduca sexta* entsteht, spezifisch verringert (Winz und Baldwin, 2001), so dass die Bildung des Nicotins vermindert wird.

Auch für die Synthese der Pyrrolizidinalkaloide konnte der Schnittpunkt des Überganges vom Primär- zum Sekundärstoffwechsel identifiziert werden. So erfolgt die Synthese der Necinbase aus Arginin, welches über Putrescin zum Homospermidin umgesetzt wird (Hartmann, 1999). Homospermidin stellt die erste spezifische Substanz des Sekundärstoffwechsels dar, die keinem weiteren Abbau bzw. Reintegration in den Primärstoffwechsel unterliegt. Das verantwortliche Enzym, welches somit den Schnittpunkt zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel markiert, konnte als Homospermidinsynthase (HSS, EC 2.5.1.45) identifiziert werden (Böttcher et al., 1993). Die HSS überträgt in einer NAD<sup>+</sup>-abhängigen Reaktion eine Aminobutylgruppe von Spermidin auf Putrescin. Das entstehende Homospermidin wird in einer bislang nicht geklärten Reaktionsfolge zur Necinbase. Als konsekutives Enzym wird eine Diaminoxidase diskutiert, so dass vermutlich über ein Dialdehyd die Necinbase entsteht.

Wie die PMT unterliegt die HSS als erstes, sekundärstoffwechsel-spezifisches Enzym der PA-Biosynthese verschiedenen Regulationsmechanismen. Expression und Aktivität der HSS werden sowohl räumlich als auch temporär koordiniert gesteuert. So wird die Expression und Aktivität der HSS in *Senecio*-Arten (*S. vernalis* und *S. jacobaea*) auf die Cortexparenchymzellen und Endodermiszellen der Wurzel beschränkt, die in unmittelbarer Nähe des Phloems sind (Moll et al., 2002; Anke et al., 2004). Durch nachfolgende Syntheseschritte wird ein Alkaloidgrundkörper (in *Senecio*-Arten ist dies das Senecionin) synthetisiert, der über bislang nicht geklärte Transportmechanismen über das Phloem in oberirdische Pflanzenteile (Sproßperipherie, Blüten u. a.) verteilt und z. T. durch pflanzenspezifische Derivatisierungen verändert wird (Hartmann und Zimmer, 1986, Hartmann, 1999). Somit werden die PAs in den *Senecio*-Arten in unmittelbarer Nähe ihres „Vertriebsweges“ synthetisiert. Entwicklungsabhängige Expression und Aktivität der HSS ließen sich auch bei *Eupatorium cannabinum* nachweisen. Die Expression der HSS erfolgt in jungen Wurzeln der jeweiligen Vegetationsperiode bis zum Öffnen der Blüte (Anke et al., 2004). Das hohe Maß an Koordination der Biosynthese und der hierfür notwendige Energieaufwand führen zur Funktion, den die PAs für die Pflanze ausüben. Die voneinander unabhängige Rekrutierung und fortlaufende Präsenz der Homospermidinsynthase in mehreren, nicht verwandten Pflanzenfamilien (Reimann et al., 2004; Ober, 2005) dokumentiert einen offenbar hohen Wert der PAs für diese Pflanzen. Bislang liegen jedoch nur wenige direkte Nachweise zur Funktion der PAs für Pflanzen vor. Die gewebespezifische Akkumulation der PAs in peripheren Geweben und Blüten legt eine Schutzfunktion der PAs nahe (Hartmann und Zimmer, 1986). Dies konnte bei Insekten erstmals durch die letalen Folgen einer PA-haltigen Nahrung bei dem Herbivoren *Philosamia ricini* (Lepidoptera, Saturniidae) nachgewiesen werden (Naberhaus et al., 2005). Dieser Generalist verfügt offenbar über keine Sinneswahrnehmungen, die zur Diskriminierung von PA-haltiger Nahrung führt.

Die für die letalen Folgen bei *Philosamia ricini* verantwortlichen Wirkmechanismen von Pyrrolizidinalkaloiden sind bereits zum Teil auf biochemischer und molekularer Ebene verstanden. So werden die PAs in ihrer in den meisten Pflanzen bevorzugten Speicherform als Pyrrolizidinalkaloid *N*-Oxid aufgenommen. Während der Passage durch den Magen-Darm-Trakt

werden die Pyrrolizidinalkaloid *N*-Oxide im reduktiven Darmmilieu zur korrespondierenden Base reduziert. Diese kann durch passives Permeieren von Biomembranen aufgenommen werden (Lindigkeit et al., 1997). Nach der Distribution werden die PAs in praktisch allen bekannten Fällen zur Verbesserung der Exkretion metabolisiert. Hierfür sind bislang drei mögliche Metabolisierungen bekannt (Fu et al., 2002). Ein geringer Anteil der Esteralkaloide wird durch mikrosomale und cytosolische Carboxyesterasen bei Ratten und Mäusen in die Bestandteile Necinsäure und Necinbase hydrolytisch gespalten. In einer sukzessiven Phase II Reaktion wird die Necinbase zum Teil mit Glutathion konjugiert. Dieser Reaktionsweg stellt für die Entgiftung von Xenobiotika eine typische Metabolisierung dar, die zu besser ausscheidbaren Reaktionsprodukten führt. Die jedoch wichtigere enzymatische Umsetzung, die die Toxizität der PAs bedingt, stellt die Metabolisierung durch mikrosomale Cytochrom P450-Enzyme zu reaktiven Pyrrolderivaten dar. Dies konnte für Senecionin an humanen, mikrosomalen Präparationen der Leber nachgewiesen werden (Miranda et al., 1991). Die überaus reaktionsfähigen Pyrrolderivate reagieren mit DNA und Proteinmolekülen zur einer Reihe von Produkten, von denen die DNA-Pyrrol-Verbindungen (DNA-Addukte) als Marker für die carcinogene Potenz herangezogen werden können (Fu et al., 2002). Bei einigen Organismen konnte ein dritter Metabolisierungsweg identifiziert werden, der essentiell für die Resistenz dieser Herbivoren gegen Pyrrolizidinalkaloide ist. So konnte bei Schafen, Meerschweinchen und angepassten Insekten die Bildung des korrespondierenden *N*-Oxids nachgewiesen werden.

Die schützende Wirkung der Pyrrolizidinalkaloide durch Schädigungen, die zum Tode von Herbivoren wie *P. ricini* führen können, vollzieht sich bei anderen nicht angepassten Fraßfeinden offenbar noch auf andere Weise. So werden PA-haltige Arctiiden von der Fledermaus *Eptesicus fuscus* erst nach Probieren weitgehend als Nahrung abgewiesen (Hristov und Conner, 2005). Dies weist auf eine sensorische Erkennung durch den Geschmack hin. In Übereinstimmung hierzu konnte auch bei Trichterspinnender Gattung *Nephila* eine Differenzierung PA-haltiger Beute belegt werden, die zu einem weitgehenden Verzicht führt (Orr et al., 1996). Unterstützt wird dies auch durch Beobachtungen bei Weidevieh, welches PA-haltige Pflanzen meidet und diese erst in Ermangelung anderer Nahrungsressourcen frisst. Bei den nicht angepassten Insekten fehlen bislang derartige Nachweise zur sensorischen Erkennung. Weitere Belege für die Schutzfunktion, den die PAs den Pflanzen vermitteln, liefern in erster Linie angepasste Insekten.

Angepasste Lepidopteren (Arctiiden, Nymphaliden der Unterfamilien Ithomiinen und Danaiden) können nicht nur Pyrrolizidinalkaloide in das physiologisch sichere *N*-Oxid umsetzen, sondern diese auch durch Speicherung in Hämolymphe und Integument zur eigenen Verteidigung gegen verschiedenste Fraßfeinde einsetzen (Hartman, 1999, Hartmann und Ober, 2000). In Übereinstimmung zu den angepassten Lepidopteren konnte auch bei anderen Insektengruppen wie dem Blattkäfer *Longitarsus anchusae* (Chrysomelidae) eine effektive Abwehrfunktion belegt werden, der durch die PAs einen weitgehenden Schutz vor Raubinsekten genießt (Naberhaus et al., 2005).

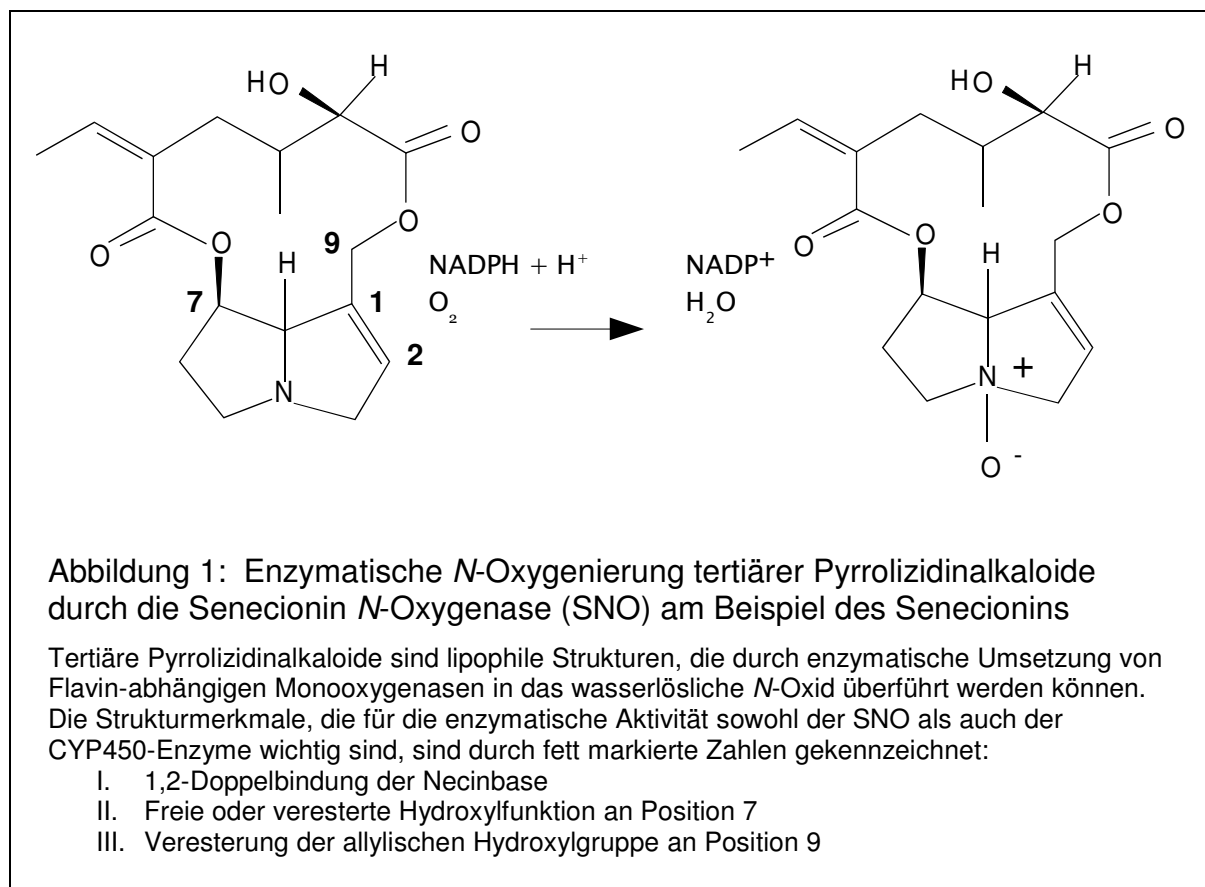
Durch neuere Untersuchungen zeichnet sich aber ein noch vielfältigeres Bild für die Verteidigung durch Pyrrolizidinalkaloide ab. PA-sequestrierende Arctiiden verfügen über einen Schutz in der Abwehr von parasitierenden Insekten. So konnte für die Raupen von *Grammiageneura* eine durch höhere PA-Gehalte verminderte Sterblichkeit durch Parasiten nachgewiesen werden (Singer et al., 2004). Die Schutzfunktion gegen Parasiten konnte am Beispiel von PA-haltigen Eiern von *Utetheisa ornatrix* bestätigt werden (Bezzarides et al., 2004). Gerade die Vielfalt der



Anpassungsformen, die von Insekten entwickelt worden sind, demonstrieren die hohe Bedeutung der PAs, die sie als (pflanzliche) Sekundärstoffe in der chemischen Abwehr von Fraßfeinden haben.

### 1.3 Strategien der Anpassung von Insekten an Pyrrolizidinalkaloide

Pflanzen, die Pyrrolizidinalkaloide synthetisieren, verfügen mit diesen pflanzlichen Sekundärstoffen über eine effektive chemische Abwehr (Hartmann, 1999, Hartmann und Ober, 2000). In der Wechselwirkung mit diesen Pflanzen entwickelten einzelne Insektengruppen aber Mechanismen auch diese chemische Barriere zu überwinden. Sie können somit diese Pflanzen als Nahrungsressource verwenden, die anderen nicht angepassten Herbivoren versagt bleibt. Hierfür mussten jedoch Mechanismen entwickelt werden, so dass die PAs ihre Toxizität nicht entfalten können. Bei einigen Insekten wie *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) konnte eine effektive Exkretion von Pyrrolizidinalkaloiden nachgewiesen werden (Lindigkeit, 1996), so dass diese vor einer Bioaktivierung durch CYP450-Enzyme ausgeschieden werden.



Die Anpassungsformen anderer Insekten imponiert nicht nur durch die Verwendung PA-haltiger Pflanzen als Nahrungsressource sondern eben auch in der Sequestrierung und Verwendung als chemische Abwehr (Hartmann und Ober, 2000, Hartmann, 2004a). Hierbei wurden ganz unterschiedliche Strategien entwickelt die PAs physiologisch sicher zu handhaben und effektiv als chemische Abwehr einzusetzen. Die leichte ambivalente Konvertierbarkeit zwischen tertiären Basen und den *N*-Oxiden dieser PAs ist als Grundlage dieser Anpassungen zu sehen

(Abbildung 1). Pyrrolizidinalkaloide liegen in Pflanzen in aller Regel als physiologisch sichere *N*-Oxide vor. Diese werden nach Aufnahme bei Herbivoren im Darmmilieu zu tertiären Basen reduziert und können nunmehr passiv die Darmwand permeieren (Lindigkeit, 1996). Nach der Aufnahme besteht bei praktisch allen bekannten Tieren die Möglichkeit, dass die tertiären Basen durch CYP450-Enzyme zu reaktiven Pyrrolderivaten umgesetzt werden. Um diese Biotoxifizierung zu vermeiden, wurden bei angepassten Insekten verschiedene Mechanismen entwickelt.

So wurden bei dem Blattkäfer *Platyphora boucardi* (Chrysomelidae) effektive Mechanismen entwickelt, die tertiären Pyrrolizidinalkaloide quantitativ in Abwehrdrüsen aufzunehmen und dort zu speichern, so dass nur geringe Hämolymphe Spiegel erreicht werden (Hartmann et al., 2003, Hartmann, 2004a). Die Speicherung der tertiären Basen konnte auch bei der Blattlaus *Aphis jacobaeae* (Aphididae) nachgewiesen werden (Witte et al., 1990). Eine andere Strategie ist bei den Blattkäfern der Gattung *Oreina* (Chrysomelidae) verwirklicht. So wird die Reduktion aufgenommener *N*-Oxide im Darm unterbunden, die trotz ihrer Polarität aufgenommen werden. Im Gegensatz zu dem passiven Permeieren der Darmwand ist für diese Resorption ein pyrrolizidinalkaloidspezifischer Transporter notwendig. Die *N*-Oxide in der Hämolymphe bilden einen Pool, aus dem nach Bedarf exokrine Abwehrdrüsen aufgefüllt werden. Tertiäre PAs werden hingegen passiv aufgenommen und durch Glykosylierung metabolisiert (Hartmann, 1999). Die besonders bei den PA-sequestrierenden Lepidopteren Arctiidae und den Unterfamilien Danainae und Ithomiinae der Nymphalidae etablierte Strategie nutzt die Konvertierung tertiärer Pyrrolizidinalkaloide in das physiologisch sichere *N*-Oxid (Abbildung 1). So werden die PAs als tertiäre Basen im Darm resorbiert und in einer spezifischen Reaktion quantitativ in das *N*-Oxid überführt. Für diese Reaktion konnte bei *Tyria jacobaeae* (Arctiidae) eine lösliche Flavin-abhängige Monooxygenase identifiziert werden, die als ein extrazelluläres Enzym in der Hämolymphe lokalisiert ist (Lindigkeit et al., 1997, Naumann et al., 2002).

Die Bedeutung, den die Pyrrolizidinalkaloide als Teil der chemischen Abwehr von Fraßfeinden angepasster Lepidopteren haben, lässt sich anhand einer Reihe anderer Anpassungsmechanismen erraten. Für Arctiiden wie *Grammia geneura* und *Estigmene acrea* konnte eine PA-spezifische Sensorik nachgewiesen werden (Bernays et al., 2002a, Bernays et al., 2002b), die das Fressen von PA-haltigen Futterpflanzen stimuliert. Die während der Raupenstadien aufgenommenen PAs werden über die Puppe zum adultem Stadium transferiert. In einigen Arten konnte darüber hinaus nicht nur die bloße Sequestrierung und Speicherung der PAs, sondern sogar die Partialsynthese insektenspezifischer Pyrrolizidinalkaloide belegt werden (Hartmann und Ober, 2000, Hartmann 2004). Hierbei werden komplexe PA-Strukturen hydrolytisch gespalten und die Necinbase mit einer insektenspezifischen Necinsäure verestert.

In einigen Arctiiden (*Cretonotos transiens*, *Utetheisa ornatrix*) werden PAs zur Synthese des Pheromons Hydroxydanaidal verwendet. Dieses Pheromon wird in Abhängigkeit von der zugeführten PA-Menge synthetisiert und von den Männchen über spezifische Emissionsorgane, die Coremata, abgegeben. Der Fortpflanzungserfolg der Männchen wird maßgeblich durch die Menge des emittierten Hydroxydanaidal bestimmt. Hohe Konzentrationen des Pheromons erhöhen die Attraktivität für die Weibchen, da während der Kopulation das Männchen über die Spermatophore einen Teil der PAs auf das Weibchen bzw. die Eier überträgt. Für die Eier konnte durch die Zufuhr von Pyrrolizidinalkaloiden eine Schutzwirkung gegen Ameisen und Parasiten belegt werden. Aber auch für die adulten Tiere spielen PAs eine wichtige Rolle als Bestandteil ihrer chemischen Abwehr. So konnte für dämmerungs- und nachtaktive Arctiiden eine Schutzwirkung gegen die Fledermaus *Eptesicus fuscus* nachgewiesen werden (Hristov und Conner, 2005). Tag- und

dämmerungsaktive Arctiiden demonstrieren ihre Wehrhaftigkeit durch eine aposematische Warnfärbung. Das Aufnahmeverhalten einiger Nymphaliden von PAs, die ebenfalls über eine aposematische Warnfärbung verfügen, weist ebenfalls auf eine über die Ernährung der Raupen durch Nutzung von pyrrolizidinalkaloid-haltigen Pflanzen hinausgehende Funktion hin. So nehmen Nymphaliden wie *Placidula euryanassa* und *Miralera cymothoe* PAs ausschließlich gezielt über den Nektar oder durch verrottende Pflanzenteile (Pharmakophagie) als adulte Tiere auf (Freitas et al., 1996).

In allen bislang untersuchten Lepidopteren sind die vielfältigen Anpassungen aber an die Fähigkeit geknüpft, tertiäre PAs in das *N*-Oxid umsetzen zu können (Abbildung 1). Bei *Tyria jacobaeae* (Arctiidae) wird die enzymatische Reaktion von einer Flavin-abhängigen Monooxygenase katalysiert, die aufgrund ihrer Spezifität für Pyrrolizidinalkaloide vom Senecionintyp als Senecionin *N*-Oxygenase (SNO) benannt wurde. Diese war zu Beginn dieser Arbeit bereits auf biochemischer und molekularer Ebene gut charakterisiert (Lindigkeit et al., 1997, Naumann et al., 2002). Die SNO ist damit die erste charakterisierte Flavin-abhängige Monooxygenase von Insekten, der im Gegensatz zu anderen ebenfalls bekannten FMOs der Insekten eine eindeutige Funktion zugewiesen werden konnte (Lindigkeit et al., 1997). Als ein extrazelluläres Enzym wird die SNO mit einer N-terminalen Signalsequenz im Fettkörper synthetisiert (Naumann, 2003). Diese Signalsequenz adressiert die SNO für den vesikulären Transport, so dass sie aus den Zellen ausgeschleust und in die Hämolymphe entlassen wird. Sie katalysiert mit NADPH als Cosubstrat die *N*-Oxygenierung von tertiären Pyrrolizidinalkaloiden. Von den von Lindigkeit et al. (1997) untersuchten Substraten wurden von der SNO von *T. jacobaeae* nur diejenigen in das *N*-Oxid umgesetzt, die bestimmte Strukturmerkmale aufwiesen (Abbildung 1, S. 5). Für Pyrrolizidinalkaloide wie PAs vom Phalaenopsintyp, denen eines oder mehrere dieser Strukturmerkmale fehlen, konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

Die SNO ermöglicht *Tyria jacobaeae* erst die physiologisch sichere Handhabung der Pyrrolizidinalkaloide ihrer bevorzugten Wirtspflanze *Senecio jacobaea*. Sie ist somit das Schlüsselenzym für alle weiteren Anpassungsmechanismen. Ithomiinen wie *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera, Nymphalidae) können sowohl als Raupe als auch als adultes Tier PAs *N*-Oxygenieren (Brückmann et al., 2000). Die Fähigkeit, PAs durch Bildung der *N*-Oxide zu entgiften, konnte auch bei Vertretern der Ordnung Coleoptera wie den *Longitarsus*-Spezies (z. B. *L. exoletus*, Chrysomelidae) belegt werden (Naberhaus et al., 2003). So konnte eine mit dem Fettkörper assoziierte *N*-Oxid-Bildung für die Heuschrecke *Zonocerus variegatus* (Orthoptera, Pyrgomorphidae) nachgewiesen werden (Biller, 1993, Lindigkeit et al., 1997). Die Bildung von Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxiden muss jedoch nicht immer auf eine Flavin-abhängige Monooxygenase zurückzuführen sein. So konnte bei humanen Microsomenpräparationen ein CYP450-Enzym identifiziert werden (Miranda et al., 1991), welches die Bildung von Senecionin-*N*-Oxiden katalysieren kann. Ob auch bei anderen Arctiiden die Aktivität auf eine Flavin-abhängige Monooxygenase zurückzuführen ist, soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Für nahe Verwandte von *Tyria jacobaeae* der Unterfamilie Arctiini wie *Arctia caja* ist bereits eine *N*-oxygenierende Aktivität belegt (Lindigkeit, 1996). Arctiiden dieser Unterfamilie sind deshalb aussichtsreiche Kandidaten für die molekulare Identifizierung und Charakterisierung weiterer Flavin-abhängiger Monooxygenasen, die über eine *N*-oxygenierende Aktivität verfügen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Grund-Chemikalien und Gase wurden, soweit nicht anders erwähnt, in „pro analysis“ bzw in „reinst“ Qualität von den Firmen Sigma, Fluka, Serva, Roth, Gerbu und Westfalen bezogen.

Die wässrigen Lösungen wurden, sofern nicht anders beschrieben, mit Milli-Q-Wasser (Millipore) hergestellt. Alle weiteren Chemikalien werden im Folgenden namentlich aufgeführt.

#### 2.1.1 Antibiotika

Ampicillin Natriumsalz	Roth
Chloramphenicol	Sigma
Gentamycin	Invitrogen
Kanamycinsulfat	Roth
Chlortetrazyklin	Serva; Sigma
Fungizon	Invitrogen

#### 2.1.2 Gelelektrophoresen

AGAROSE-GEL	
Agarose, NEEO Ultraqualität	Roth
Low melt Agarose	Roth
Ethidiumbromid, 10 mg/ml	Roth
Nukleinsäuren Molekulargewichtsmarker	Invitrogen
Bromphenolblau	Merck
Xylencyanol	Sigma
Ficoll 400	Sigma

SDS-PAGE	
Rotiphorese® 30 (Acrylamidlösung)	Roth
Ammoniumpersulfat	Biomol
Natriumdodecylsulfat (SDS) > 99 %	Biomol
TEMED	Biomol
Comassie Brilliant Blue R-250	ServaF

#### 2.1.3 Western-Blotting

WESTERN-BLOTTING	
Triton X-100	Fluka
Glycin	Fluka
Tween 20	Fluka
Fount India Tinte	Pelikan
ECL™ Western Blotting Reagenzien	Amersham
	Biosciences (GE Healthcare)

### 2.1.4 Dialyse und Proteinfaltung

Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Flavinadenindinukleotid, Natriumsalz (FAD)	AppliChem
reduziertes/oxidiertes Glutathion	AppliChem
Natrium <i>N</i> -Lauroylsarcosin > 94 %	Sigma
Dialysierschlauch Visking™	Roth
Cystein	AppliChem
Cystin	AppliChem
GuanidiniumHydrochlorid	Fluka

### 2.1.5 Aktivitätsbestimmungen

NADPH	Gerbu
Monocrotalin > 99 %	Aldrich

### 2.1.6 Enzyme

REVERSE TRANSKRIPTION:	
SuperScript™ III RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	Invitrogen
RevertH <sup>-</sup> Reverse Transkriptase	MBI Fermentas

POLYMERASE-KETTEN-REAKTION:	
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen
<i>Pfx</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen

RESTRIKTIONSENZYME (ENDONUCLEASEN)  
Restriktionsenzyme wurden von den Firmen NEB Biolabs und MBI Fermentas bezogen und nach den Angaben der jeweiligen Firma in den hierfür vorgesehenen Puffern eingesetzt.

KLONIERUNGSREAKTION	
T4-DNA-Ligase	Invitrogen

### 2.1.7 Medien und Zusätze

Agar-Agar

Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (IPTG)	Roth
Hefeextrakt	Roth
Trypton	Roth
NaCl	Fluka
KCl	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Merck
MgSO <sub>4</sub>	Merck
Glucose	Gerbu

TC-100 Medium	Cambrex/Invitrogen
Insect X-press	Cambrex/Invitrogen
Foetales Kälberserum (FBS)	Cambrex/Invitrogen
Low melt Agarose 3	AppliChem

Die verwendeten Pyrrolizidinalkaloide und radioaktiv markierten PAs wurden aus Pflanzenteilen oder aus PA-produzierenden Wurzelorgankulturen präpariert (Lindigkeit, 1996) und freundlicherweise von Claudine Theuring bereitgestellt.

### 2.1.8 Sonstiges

DC-Kieselgelplatten(Glas) 60 F <sub>245</sub>	Merck
20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm	
Röntgenfilme XOMat	Sigma
Röntgenfilmentwickler- und -fixierlösung	Sigma
Konzentratoren:	
Amicon® Ultra-4, 30 kDa	Amicon
Rühzelle mit PM30- Membran	Amicon
PD-10 Säulen mit Sephadex™ G-25	Amersham
	Biosciences
PVDF-Membran Immobilon™-P	Millipore
Sterilfilter 0,2 µm	Sarstedt
Kryovials 1 ml (sterile Schraubdeckelgefäße)	Nalgene
Cellfectin® Reagenz zur Transfektion	Invitrogen
Zellkultur Testplatte 6 (sterile Flachbodenschale, 9,03 cm <sup>2</sup> / Vertiefung)	Renner
Mikrotiterschale (96 wells, steril)	Sarstedt
Flachbodenschalen für die Zellkultur (steril)	Sarstedt
Coomassie® Brilliant Blue G-250	Serva
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf

## 2.2 Eingesetzte Kits

### AMPLIFIZIERUNG VON 5'-DNA ENDEN

5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Invitrogen

### KLONIERUNG VON PCR PRODUKTEN

TOPO™ TA-Cloning Kit, Invitrogen

### RNA ISOLIERUNG

RNA Plant Mini Kit mit Qiashredder, Qiagen

## PLASMIDISOLIERUNG

NucleoSpin Extract, Macherey-Nagel

NucleoSpin, Macherey-Nagel

GenElute HP Plasmid Midiprep Kit, Sigma-Aldrich

## PROTEINEXPRESSION

BAC-TO-BAC<sup>®</sup> Baculovirus Expressionssystem, Invitrogen

## 2.3 Vektoren

pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>-VEKTOR

Vektor des TOPO-TA-Cloning Kits (Invitrogen). Dieser Vektor hat eine Größe von 3,9 kb und liegt bereits linearisiert vor. Die Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin sind die vorhandenen Selektionsmarker des Vektors. Er verfügt an jedem 3' Ende über einen zusätzlichen 3'-Desoxythymidin-Überhang, der eine über die Phosphatgruppe kovalent gebundene Topoisomerase aufweist. Er ist deshalb für eine schnelle und einfache Ligation von PCR-Produkten geeignet, die einen 3'-Desoxyadenin-Überhang haben. Dieser wird unspezifisch durch die *Taq*-DNA-Polymerase dem PCR-Produkt angefügt. Die multiple Klonierungsstelle ist in das *lacZα*-Gen eingebettet, welches für die carboxyterminale Untereinheit der  $\beta$ -Galactosidase codiert. Durch die Unterbrechung des Leserahmens wird die Untereinheit der  $\beta$ -Galactosidase nicht mehr exprimiert. Dies ermöglicht eine Blau-Weiß-Selektion.

## pET-3A VEKTOR (NOVAGEN)

Der pET-3a Vektor ist ein Expressionsvektor für *E. coli*. Die zu exprimierende Fremd-DNA wird durch den T7-Promoter kontrolliert. Nach Induktion der T7 RNA-Polymerase von *E. coli* durch IPTG erfolgt die Expression. Die heterologe Expression von eukaryontischen Proteinen wird durch eine bakterielle Ribosomenbindungsstelle ermöglicht. Die Selektion erfolgt über die Ampicillinresistenz.

## pQE-60 VEKTOR (QIAGEN)

Der pQE-60 Vektor ist ein Expressionsvektor mit 3,4 kb für *E. coli* M15 (2.5.2, S. 17). Er verfügt über einen Phagen T5-Promotor, welcher durch die *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird. Zwei *lac*-Operatorsequenzen ermöglichen eine effiziente Kontrolle des starken T5-Promotors. Durch die synthetische Ribosomenbindungsstelle (RBS2) werden hohe Translationsraten erreicht. Der multiplen Klonierungsstelle schließt sich am 3' Ende eine Sequenz an, die für sechs aufeinanderfolgende Aminosäuren Histidin codiert. Das exprimierte Protein verfügt somit am C-terminalen Ende über eine Sequenz von sechs zusätzlichen Aminosäuren Histidin, die als HIS-Tag bezeichnet wird und mit Nickel-Ionen eine Komplexbindung ausbilden kann. So exprimierte Proteine können bei Verwendung einer Nickel-haltigen Matrix durch Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Selektion erfolgt durch die vorhandene Ampicillinresistenz.

## pREP4-GROESL VEKTOR (CASPERS ET AL., 1994)

Dieser 5884 bp große Vektor codiert für die HSP60-Chaperone GroEL und GroES. Diese beide Chaperonproteine fungieren als Faltungshelfer. Sie werden für Coexpressionen im *E. coli*-System eingesetzt, um heterolog exprimierten Proteinen die richtige Konformation zu geben. Das Plasmid verfügt weiterhin über einen *lac*-Promotor und ein Kanamycinresistenzgen.

**pRDKJG (CASPERS ET AL., 1994)**

Dieses Plasmid codiert für die HSP70-Chaperone DanK, DnaJ und GrpE. Während einer Coexpression mit dem Zielprotein fungieren auch diese Chaperonproteine als Faltungshelfer. Sie stehen unter der Kontrolle eines lac-Promotors. Die Selektion erfolgt durch eine Kanamycinresistenz.

**pFASTBac1 (INVITROGEN)**

Der pFastBac1-Vektor ist ein 4775 bp großer Expressionsvektor für das Baculovirus-Expressionsvektor-System (BEVS). Er wird für die heterologe Proteinexpression in Insektenzellen eingesetzt. Der Vektor vermittelt eine Ampicillinresistenz. In einer Expressionscassette befinden sich ein Gentamycinresistenzgen, ein baculoviruspezifischer pPolh-Promotor, eine Multiple Klonierungsstelle und ein SV40 Poly(A)-Signal. Die Expressionscassette wird eingefasst durch zwei Mini-Tn7-Elemente, die als Transposon für die Übertragung in einen virusspezifischen Vektor (Bacmid) sorgen.

**pIB/V5-HIS (INVITROGEN)**

Der pIB/V5-HIS Vektor ist ein 3521 bp großer Vektor, der für die konstitutive heterologe Proteinexpression in Insektenzellen eingesetzt wird (InsectSelect™ BSD Systems, Invitrogen). Das Plasmid verfügt zur konstitutiven Proteinexpression über den OplE2 Promotor (Theilmann, Stewart, 1992) aus dem Baculovirus *Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV). Dieser ermöglicht im Gegensatz zu dem Promotor des pFastBac-Vektors (s. o.) eine Expression bereits im frühen Infektionsstadium. Ein bakterieller Replikationsursprung ermöglicht die Vektorvermehrung in *E. coli*-Zellen. Der Vektor verfügt über Ampicillin- und Blasticidinresistenzfaktoren und eine Expressionskassette. Diese enthält neben einer Sequenz (3' Ende), die für einen HIS-Tag codiert, über eine V5-Sequenz, die zwischen der Zielsequenz und dem HIS-Tag liegt und für ein Epitop codiert. Ein käuflich zu erwerbender Antikörper (Invitrogen) erkennt das V5-Epitop und ermöglicht somit die Detektion der exprimierten Proteine.

## 2.4 Primer

Die Herstellung aller Primer für die PCR-Reaktionen wurden bei der Firma MWG Biotech AG in Auftrag gegeben.

**KONSTRUKTION VON SPEZIFISCHEN PRIMERN**

Für die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten, von denen spezifische Sequenzen am 5' bzw. 3'-Ende bekannt waren, wurden die jeweiligen spezifischen Sequenzen ausgewählt und in Auftrag gegeben. Spezifische Primer wurden für die Vervielfältigung von DNA eingesetzt, die für die Klonierung verwendet werden sollte (Kap. 2.6.7, S. 27). Spezifische Reverse-Primer wurden für die RACE-Techniken eingesetzt (Kap. 2.6.4.3).

**KONSTRUKTION VON DEGENERIERTEN PRIMERN**

Für die Amplifizierung von cDNA bisher nicht bekannten Flavin-abhängigen Monooxygenasen in Arctiden mit der PCR mussten DNA-Sequenzen festgelegt werden, gegen die Primer konstruiert werden sollten. Hierfür wurden die jeweils bekannten FMO-Sequenzen aus *Drosophila*, *Anopheles* und die SNO-Sequenz von *Tyria jacobaeae* auf Proteinebene miteinander verglichen.



Aminosäuresequenzen, die in allen bekannten FMOs vorkommen und eine möglichst hohe Übereinstimmung zueinander haben, wurden als Matrize für den Bau von Primern ausgewählt. Bei der „Übersetzung“ einer Aminosäuresequenz in die entsprechende Nukleotidsequenz ist eine eindeutige Zuordnung zu einem Basentriplett nicht möglich, da nach dem Genetischen Code zwei oder mehrere Basentriplets für ein und dieselbe Aminosäure codieren (Ausnahmen Methionin und Tryptophan). Für die Konstruktion von Primern wurden alle für die jeweiligen Aminosäure codierenden Basentriplets berücksichtigt. Dies führt dazu, dass nicht ein spezifischer Primer sondern ein Gemisch von Primern in Auftrag gegeben werden musste. Sequenzabschnitte der bereits bekannten FMO-Sequenzen, die zueinander eine hohe Übereinstimmung haben, weisen an derselben Stelle z. T. 2-3 unterschiedliche Aminosäuren auf. Dies erhöhte noch zusätzlich die Anzahl der möglichen Kombinationen bzw. Primer. Der tatsächlich passende Primer ist somit in Abhängigkeit von den Kombinationen, die bei der Synthese berücksichtigt wurden, in einer entsprechenden geringeren Konzentration vorhanden. Um die Anzahl der möglichen Kombinationen zu verringern und somit die Konzentration der passenden Primer zu erhöhen, wurde bei einigen Primern die unspezifisch bindende Base Inosin eingebaut.

In Anlehnung an die Beschreibung des Genetischen Codes werden diese Primergemische als degenerierte Primer bezeichnet. Je vielfältiger die Möglichkeiten für eine DNA-Sequenz sind, umso größer ist dann die Anzahl der möglichen Primer. Das Ausmass der möglichen Kombinationen wird auch als Grad der Degeneriertheit bezeichnet. Der jeweils mutmaßlich passende Primer liegt in Abhängigkeit von dem Degeneriertheitsgrad in deutlich geringerer Konzentration als der Gesamtkonzentration aller Primer vor, so dass eine Verringerung der Amplifizierungsrate durch Primermangel zu befürchten stand.

#### Codierung für degenerierte Primer

$H = A + T + C$	$K = G + T$	$M = A + C$	$N = A + T + C + G$
$R = A + G$	$S = C + G$	$W = A + T$	$Y = T + C$
$I = A + G + T + C$	$I = \text{Inosin}$		

#### REVERSE-PRIMER FÜR cDNA-SYNTHESE UND VERVIELFÄLTIGUNG UNBEKANNTER FMOs

(Kap. 2.6.3 bzw. Kap. 3.3.3 ff.)

Oligo(dT)-Primer: 5'- GTC GAC TCG AGA ATT C(T)<sub>17</sub>-3' (Naumann, 2003)

## 2.5 Organismen

### 2.5.1 Lepidopteren

Die untersuchten Schmetterlinge (Lepidopteren) gehören alle zur Familie der Arctiiden (Bärenspinner). Diese kann in Unterfamilien eingeteilt werden (Weller et al, 1999), von denen in der Unterfamilie der Arctiinae bereits eine Reihe von Arten bekannt waren, die PAs N-Oxygenieren können. Darüber hinaus konnte für *T. jacobaeae* (Arctiinae) die hierfür verantwortliche Flavin-abhängige Monooxygenase identifiziert werden (Lindigkeit, 1996). Bei Arten dieser Unterfamilie konnte eine Flavin-abhängige Monooxygenase erwartet werden, die für die N-Oxygenierung der PAs verantwortlich ist.

Sowohl die Raupen als auch die Falter der Arctiiden sind überwiegend in der Nacht bzw. Dämmerung aktiv. Arctiidenraupen fallen durch eine häufig sehr starke Behaarung auf. Die Raupen der meisten Arten haben eher unauffällige Färbungen wie z. B. schwarz und (rot-)braun (*A. caja*). Einige wenige Arten hingegen zeigen im Raupenstadium eine aposematische (Warn-) Färbung (*T. jacobaeae*). Alle verwendeten Raupen stammten entweder aus Zuchten oder konnten im Nationalpark Leiden (Niederlande) mit Genehmigung gesammelt werden.

#### ARCTIINAE

##### *Arctia caja* (Brauner Bär)

Ein in Europa, Asien und Nordamerika weit verbreiteter Generalist, bei dem schon zuvor eine N-Oxygenierung von PAs nachgewiesen wurde (Lindigkeit, 1996). Dieser Generalist nutzt je nach Verfügbarkeit eine besonders breite Palette an Pflanzen als Nahrungsressource. Bekannte Futterpflanzen sind z. B. Löwenzahn-, Spitzwegerich und Himbeerblätter. Die Nutzung einer PA-haltigen Futterpflanze ist nicht nachgewiesen.

##### *Arctia villica* (Schwarzer Bär)

Ein in nur ausgesuchten Standorten vorkommender Generalist Mitteleuropas. So kommt er beispielsweise vereinzelt in Süddeutschland und Italien vor. Im gesamten Mittelmeerraum ist er stellenweise noch recht häufig. Dieser Generalist wurde ausgewählt um mehr Informationen über Familien- bzw. Gattungsmerkmale der FMOs und SNO's im Vergleich zu *T. jacobaeae* und *A. caja* zu erhalten. Neben Löwenzahnblättern akzeptiert er auch Spitzwegerichblätter. Eine N-Oxygenierung war noch nicht bekannt.

##### *Grammiageneura*

Ein im Südwesten der USA (Arizona) verbreiteter Generalist, dessen N-Oxygenierung bereits gut untersucht ist. Als PA-haltige Futterpflanzen sind *Senecio longilobus* und *Plagiobothris arizonicus* (Hartmann et al., 2004) bekannt. Die Untersuchung dieses Vertreters sollte weitere Informationen über Sequenzunterschiede bzw. Übereinstimmungen der PNO in der Unterfamilie der Arctiinae liefern.

##### *Pericallia matronula* (Augsburger Bär)

Der Augsburger Bär kommt nur auf ausgesuchten Standorten in Deutschland vor. Sein gesamtes Verbreitungsgebiet erstreckt sich allerdings in einem horizontalen Band von Mitteleuropa, Eurasien, über Sibirien bis nach Korea ([www.funet.fi](http://www.funet.fi)). Als Nahrung sind eine Reihe von Futterpflanzen wie Haselnuss- und Löwenzahnblätter bekannt, die *Pericallia matronula* als Generalisten ausweisen.

Eine Besonderheit bei diesem Bär ist sein zweijähriger Vermehrungszyklus im Gegensatz zu den anderen Arctiiden, die zum Teil eine oder mehrere Generationen pro Jahr haben. Eine N-Oxygenierung war bisher noch nicht nachgewiesen.

#### *Tyria jacobaeae* (Blutbär)

*T. jacobaeae* ist ein Spezialist, der je nach Population nur wenige oder sogar nur eine Pflanze als Nahrungsressource nutzt. Er fällt durch seine aposematische Warnfärbung auf, die in den Farben schwarz und gelb als Querstreifen an Bienen oder Wespen erinnert. Die untersuchten Tiere stammen ausnahmslos aus einem Küstenstreifen südwestlich von Leiden (Wassenaar). Die Raupen leben dort in einer Dünenlandschaft direkt am Strand. Bereits wenige hundert Meter vom Ufer entfernt endet häufig ihr Verbreitungsgebiet. Die einzig bekannte Futterpflanze dort ist *Senecio jacobaea*, die regelmäßig flächenweise abgefressen wird, so dass zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt die Raupen bei den noch wenigen verbleibenden Futterpflanzen gehäuft auftreten. Einige der Raupen lassen sich aber auch auf der Blattunterseite von dem dort weit verbreiteten Sanddorn finden. Dabei handelt es sich vermutlich um Raupen, die kurz vor der Verpuppung stehen. Der Grenzverlauf des Verbreitungsgebietes von *T. jacobaeae* zum Binnenland ist gut zu erkennen, da diese durch das abrupte massenweise Auftreten von nicht fraßgeschädigten *S. jacobaea* indirekt angezeigt wird. Die nur noch sehr wenig verbleibenden Pflanzen innerhalb dieses Küstensaumes sind häufig durch eine Lebensgemeinschaft von Läusen und Ameisen besetzt. Erst nachdem die Raupen von *T. jacobaeae* die Nahrungsaufnahme beendet haben, können die stark geschädigten Pflanzen innerhalb des Verbreitungsgebietes erneut austreiben und ihre Entwicklung bis zur Fruchtbildung fortsetzen.

#### *Hyphoraia aulica* (Hofdame)

*H. aulica* ist ein polyphager Arctiid, der auf Magerwiesen in Mittel- und Osteuropa auftritt. Als Futterpflanzen sind Löwenzahn und Schafgarbe bekannt. Eine N-Oxygenierung war bisher noch nicht nachgewiesen. Darüber hinaus wurde er eingesetzt, um in Vorversuchen die Bedingungen für Aktivitätsteste der Induktion der SNO zu ermitteln. Die erhaltenen Raupen konnten jedoch nicht genauer bestimmt werden, da die für die Verpuppung und spätere Bestimmung als Falter bestimmten Tiere starben. Deshalb ist die genaue Artspezifikation nicht bestätigt.

#### LITHOSIINAE

##### *Eilema albicosta* (Flechtenbär)

*E. albicosta* ist ein Endemit der Kanarischen Inseln, der sich von Flechten ernährt. Da sowohl eine N-Oxygenierung noch nicht nachgewiesen war als auch die Tatsache, dass diese Gattung der Arctiiden der Unterfamilie der Lithosiinae zugeordnet wird (Weller, 1999), machten eine Untersuchung der N-Oxygenierung interessant. Die Identität der erhaltenen Raupen konnte jedoch nicht bestätigt werden, da die für die Verpuppung und spätere Bestimmung als Falter bestimmten Tiere starben.

#### 2.5.1.1 Haltung und Fütterung

Die Raupen wurden in der Vegetationszeit mit den jeweiligen Futterpflanzen und im Winter mit Kunstfutter versorgt. Die Haltung erfolgte in Kunststoffgefäßen bei Raumtemperatur.

Arctiid	Eingesetzte Futterpflanze(n)
<i>A. caja</i>	<i>Taraxacum officinale</i> , <i>Rubus fruticosus</i> , <i>Senecio jacobaea</i> , <i>Plantago lanceolata</i>
<i>A. villica</i>	<i>Taraxacum officinale</i> , <i>Plantago lanceolata</i> , <i>Senecio jacobaea</i>

<i>E. albicosta</i>	Flechten, die auf verschiedenen Obstgehölzen oder auf <i>Corylus avellana</i> wuchsen
<i>G. geneura</i>	Kunstfutter ohne PA
<i>H. aulica</i>	Kunstfutter ohne PA, Kunstfutter mit gefriergetrockneten Blüten von <i>S. vernalis</i>
<i>P. matronula</i>	<i>Taraxacum officinale</i> , <i>Senecio jacobaea</i>
<i>T. jacobaeae</i>	<i>Senecio jacobaea</i>

#### Kunstfutter:

Gemahlene, weiße Bohnen	88	g
Ascorbinsäure	4	g
Cholesterin	0,55	g
Sobinsäure	0,3	g
Paraformaldehyd	0,2	g
Glucose-Monohydrat	0,3	g
Calciumchlorid-Dihydrat	0,08	g
Natriumchlorid	0,08	g
Di-Kaliumhydrogenphosphat	0,05	g
Magnesiumchlorid Heptahydrat	0,20	g

Die Vormischung wurde mit 17,5 g Agar-Agar in 550 ml heißes Wasser eingerührt. Aufgrund der hohen Konsistenz wurde heißes Wasser hinzugefügt bis eine rührbare Konsistenz erzielt wurde. Das Kunstfutter wurde nach kurzem Abkühlen in Kunststoffbehälter gefüllt. Ein kleiner Teil wurde frisch bei + 4°C gelagert und für die Fütterung eingesetzt. Der größere Anteil wurde bis zur Verwendung bei – 20°C eingefroren.

## 2.5.2 *E. coli*

### 2.5.2.1 *E. coli*-Stämme

#### DH5α (Invitrogen) und XL1-Blue (Stratagen)

Durch eine Mutation der DNA-spezifischen Endonuklease 1 und der mangelnden Fähigkeit zur homologen Rekombination werden Transformationseffizienz, Ausbeute und Qualität von isolierter Vektor-DNA verbessert. Somit sind diese *E. coli* Stämme besonders geeignet zur Subklonierung und Vektorvermehrung.

#### TOP10 (Invitrogen)

Für die Klonierung mit dem TOPO-TA-Cloning Kit standen chemisch kompetente TOP10 Zellen zur Verfügung. Sie verfügen über den 3'-Abschnitt des LacZ-Gens, welches für den carboxyterminalen Teil der β-D-Galactosidase codiert. Durch Vektoren, die über die Informationen für den 5'-Abschnitt der β-D-Galactosidase verfügen (Kap. 2.3), ist ein Blau-Weiß-Screening transformierter Zellen möglich.

#### BL21 (DE3) (Novagen)

Dieser Stamm wurde für die heterologe Expression mit dem T7-RNA Polymerase/Promotorsystem (Studier et. al., 1990) eingesetzt. Der Promotor und somit die Expression sind durch die Lactose-Strukturanaloge Verbindung Isopropyl-1-thio-β-galactopyranosid (IPTG) induzierbar.

**DH10Bac™ (Invitrogen)**

Als Bestandteil des BAC-TO-BAC Expressionsvektor-Systems kann mit diesem *E. coli* eine gerichtete Transposition der gewünschten Sequenz in einen Expressionsvektor vollzogen werden. Zu diesem Zweck verfügt dieser *E. coli*-Stamm über ein Helferplasmid pMON7124, welches zum einen für eine Tetrazyklinresistenz und zum anderen für eine Transposase codiert. Durch dieses Enzym wird die Transposition des gewünschten Inserts in den Baculovirus-Shuttle-Vektor (Bacmid) katalysiert. Das Bacmid bMON14272 weist eine lacZ $\alpha$ -Sequenz auf, welche innerhalb einer Bindungssequenz für das bakterielle Transposon Tn7 (mini-att Tn7) hat. Wird das Zielgen in die Sequenz für das lacZ $\alpha$ -Peptid durch die Transposition eingefügt, erfolgt Transformation bzw. Transposition. Die *E. coli* Stämme mit Insert im Bacmid erscheinen deshalb als transparente Kolonien im Gegensatz zu den Wildtyp-Bacmid Kolonien, die als blaue Kolonien gut differenzierbar sind. Das Bacmid vermittelt zusätzlich eine Kanamycinresistenz.

**M15 [pREP4] (Qiagen)**

Dieser Expressionsstamm ist vortransformiert mit dem Vektor pREP4. Dieser vermittelt eine Kanamycinresistenz und dient der Expressionsregulation der Zielgene des pQE60-Vektors. Der pREP4-Vektor verfügt über das lac 1-Gen und exprimiert konstitutiv das lac-Protein, welches als Repressor des T5-Promotors die Expression des Zielgens unterdrückt. Nach Zugabe von IPTG wird die konstitutive Suppression der Expression durch Bindung des IPTG an das lac-Protein aufgehoben. Die zelleigenen RNA-Polymerasen können die Transkription aufnehmen. Das Plasmid pREP4 ist kompatibel mit allen (Expressions-) Vektoren, die einen ColE1 Replikationsursprung aufweisen.

**2.5.2.2 Anzucht der *E. coli* -Zellen**

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium bei 37°C. Die LB-Flüssigmedien wurden mit 220–250 Upm geschüttelt und für Expressionen bei 18°C, 26°C bzw. 37°C inkubiert.

**LURIA-BERTANI-(LB)-MEDIUM (SAMBROOK, 1989)**

Trypton	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1,0 % (w/v)
auf pH 7,5 mit NaOH einstellen	

Für die Herstellung von Festmedium-Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,2 % (w/v) Agar-Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

Die Selektion auf Zellen, die bestimmte Plasmide enthielten, erfolgte durch die Zugabe von Antibiotika. So wurden je nach Resistenzfaktor folgende Antibiotika dem Medium zugefügt:

Antibiotikum	Stammlösung	Konzentration im Ansatz
Ampicillin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 – 300 µg/ml
Gentamycin	7 mg/ml in H <sub>2</sub> O	7 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 – 100 µg/ml
Chlortetrazyklin	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	10 µg/ml

Kurz vor der Verwendung wurden die entsprechenden Antibiotika steril auf die Agarplatten aufgetragen bzw. dem Medium zugesetzt. Zur Sicherung von transformierten Klonen wurden Dauerkulturen angelegt. Hierfür wurden 750 µl einer Bakterienkultur mit 250 µl eines 60 % (v/v) Glycerin-LB-Mediums versetzt. Die so angefertigten Dauerkulturen wurden dann bei – 80°C gelagert.

### 2.5.3 Insektenzellen

Für die Vermehrung von Baculoviren und zur Proteinexpression mit Baculoviren wurden Insektenzellen (Sf9) verwendet, die sich von Ovarialzellen der Art *Spodoptera frugiperda* ableiten. *Spodoptera frugiperda* gehört zur Familie der Noctuidae (Lepidoptera). Die Zellen wurden von der Fa. Novagen bezogen.

#### MEDIEN

##### TC100

Die routinemäßige Kulturhaltung der Sf9-Zellen erfolgte in gebrauchsfertigem TC100, welches von der Fa. Cambrex bezogen wurde und mit 10 % foetalem Kälberserum (FBS) ergänzt wurde. Für die Virustiterbestimmung wurde es aus dem Pulvermedium nach Herstellerangaben (Invitrogen) angesetzt. Da das Medium hitzelabil ist, wurde es nach der Herstellung mit einem 0,2 µm Spritzen-Vorsatzfilter (Sarstedt) sterilfiltriert.

##### Insect X-Press

Dieses serumfreie Medium wurde von der Fa. Invitrogen gebrauchsfertig bezogen und für die Expression mit Baculoviren verwendet. Rekombinante Proteine können in Sf9-Zellen heterolog exprimiert werden. Diese können intrazellulär vorliegen oder durch Signalsequenzen in den Extrazellulär-Raum sezerniert werden. Um den Reinigungsaufwand für sezernierte Proteine im Vergleich zu rekombinanten Proteinen, die intrazellulär verbleiben und aus Zellaufschlüssen gereinigt werden müssen, gering zu halten, wurde das Protein-freie Medium Insect X-Press für die Expression eingesetzt. Die Sf9-Zellen mussten an dieses Medium vor der Expression adaptiert werden, da die Zellen in der Umstellungsphase etwas weniger vital waren (Zellvermehrung). Auch der Zusatz von Antibiotika wurde in diesem serumfreien Medium von den Sf9-Zellen etwas weniger gut als in TC100 + 10 % FBS vertragen.

#### 2.5.3.1 Quantitative Bestimmung der Sf9-Zellen

Die Quantifizierung der Sf9 Suspensionen erfolgte mit einer Neubauer-Kammer. Die Neubauer-Kammer ist ein dickerer Objektträger, der zwei eingeritzte Zählnetze mit genau definierter Fläche aufweist. Die Fläche ist schachbrettartig durch drei Untereinheiten geteilt. Für die Auszählung der Zellen wurden die sich jeweils in den Ecken befindenden Großquadrate ausgezählt. Die Großquadrate sind noch einmal in 16 Kleinquadrate unterteilt. Durch Fläche und Schichthöhe bis zum Deckgläschen ergibt sich ein Volumen von 0,1 µl je Großquadrat. Die zu bestimmenden Proben wurden für eine Auszählung mit TC100 + 10 % FBS so verdünnt, dass nach dem Zusatz (1:2) einer Trypanblaulösung eine Zellzahl von ca. 20 – 70 Zellen je Großquadrat erzielt wurde. Diese Färbung ermöglichte eine Differenzierung von lebenden (transparenten) und bereits abgestorbenen (blauen) Zellen. Ausgezählt wurden die Zellen von vier Großquadraten und der arithmetische Mittelwert der Zellen je Großquadrat errechnet. Die Gesamtkonzentration in einem ml ergibt sich wie folgt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Arithmetischer Mittelwert je Großquadrat} * \text{Gesamtverdünnung} * 10\,000$$

### 2.5.3.2 Kulturhaltung

Die Kulturführung erfolgte stets steril und bei + 27°C im Inkubationsschüttler (Infors® HT Minitron) mit 50 Upm. Das jeweilige Medium wurde direkt vor der Verwendung mit einem 0,2 µm Sarstedt-Vorsatzfilter sterilfiltriert. Die Sf9-Zellen wurden routinemäßig in folgenden zwei Kulturformengeführt:

#### ADHÄRENTE KULTUR

Die Sf9-Zellen konnten als adhärent wachsende Zellschicht in einer sterilen und pyrogenfreien Flachbodenschale (Sarstedt) bei + 27°C kultiviert werden. Die Aufnahme der Kulturführung von kryokonservierten Insektenzellen erfolgte in sterilen Mikrotiterschalen als adhärent wachsende Zellen. Diese Wachstumsform ist im Vergleich zur Suspensionkultur deutlich schonender und ist deshalb besser für die erst noch empfindlichen, frisch aufgetauten Zellen geeignet. So konnte auch das Medium ausgetauscht werden, ohne dass die adhärennten Zellen in ihrem Wachstum gestört werden mussten. Die routinemäßig geführten adhärennten Kulturen dienten als steriles Reservoir für Suspensionskulturen der Sf9-Zellen. Die adhärennten Zellen wurden zweimal wöchentlich in einem 3 bzw. 4 Tagesrhythmus in frisches Medium umgesetzt. Hierfür wurde die jeweilige Zellschicht zuerst bei 100 bzw. 400-facher Vergrößerung mikroskopiert. Die jeweilige Aussaatmenge wurde dann empirisch festgesetzt. Zuerst wurde der verbrauchte Mediumüberstand mit einer 5 ml Plastikpipette abgenommen. Die adhärennte Zellschicht wurde mit einem ml TC100 + 10 % FBS von der Wachstumsfläche abgespült und resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde mit 4 ml frischem Medium ergänzt. Von dieser Suspension wurde je nach Wachstumsdichte ein Volumen von 0,3 – 2,5 ml in eine neue Flachbodenschale pipettiert und mit weiterem Medium auf 5 ml aufgefüllt.

#### SUSPENSIONSKULTUREN

Zur Kulturhaltung von Sf9-Zellen als Suspensionskultur wurden resuspendierte Zellen einer adhärennten Kultur auf eine Zellzahl von  $2,5 - 6 \times 10^5$  Zellen/ml Medium eingestellt. Die Kultur erfolgte in TC100 + 10 % FBS und 1 % Pluronic 68, einem Polymer, welches die durch das Schütteln des Mediums auf die Zellen einwirkenden Scherkräfte abmildert. Zu Beginn der Kultur wurden die Zellen bei + 27°C mit 30 -35 Upm in einem 250 bzw. 300 ml Erlenmeyerkolben geschüttelt. Die Suspensionskulturen wurden wie die adhärennt gewachsenen Zellen in einem 3 – 4 tägigen Rhythmus umgesetzt. Nach 2-3 Passagen wurde die Geschwindigkeit um 5 Upm erhöht, bis schließlich 50 Upm erreicht wurden. Routinemäßig wurden 20 ml Suspensionskulturen angesetzt, die auf eine Zellzahl von  $2,5 - 6 \cdot 10^5$  Zellen/ml eingestellt waren. Um die Akkumulation von Stoffwechselprodukten zu vermeiden wurden die Zellkulturen nach fünf Passagen durch Zentrifugation mit 2000 Upm, 5 min (Beckmann-Zentrifuge GS-6R mit GH 3.8 Ausschwingrotor) vom verbrauchten Medium getrennt. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem Medium resuspendiert und auf 20 ml mit frischem Medium aufgefüllt. Nach mehreren Passagen und gutem Wachstum konnten Zellen an das Expressionsmedium Insect X Press adaptiert werden. Auch dieses erforderte 2 – 4 Passagen. Bei Bedarf wurden den Medien Streptomycin mit 50 - 100 µg/ml, Kanamycin mit 100 – 200 µg/ml oder Chloramphenicol mit 2 -4 µg/ml zugesetzt, um sie entweder von Kontaminationen zu befreien oder vor diesen zu schützen. An Insect X Press adaptierte Suspensionskulturen konnten für Expressionen mit den Baculoviren angeimpft werden. Suspensionskulturen werden für die Expressionen bevorzugt eingesetzt, da nach Herstellerangaben (Invitrogen) häufig eine höhere Ausbeute erzielt werden kann.

### 2.5.3.3 Kryokonservierung von Insektenzellen

Sf9-Zellen können nach speziellen Einfrierverfahren dauerhaft in flüssigem Stickstoff konserviert werden. Für die Anlage von Rückstellproben, die nach Bedarf wieder rekultiviert werden konnten, wurden Suspensionskulturen mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in TC100 + 10 % FBS ausgesät. Diese Zellen wurden für 48 h bei + 27°C und 45 Upm inkubiert, so dass sie sich für das Einfrieren in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Zuvor wurde das verbrauchte Medium der 48 h-Kultur nach Zentrifugation (5 min, 2000 Upm, Beckmann-Zentrifuge) entfernt. Die Zellen wurden dann in TC100 + 20 % FBS auf eine Zellzahl von  $1,3 - 1,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und kurz auf Eis gekühlt. Kurz vor dem Einfrieren, der vorbereiteten Suspensionen wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) zugefügt, so dass die Konzentration im Ansatz 20 % betrug. Da DMSO bei Raumtemperatur seine zytotoxische Wirkung entfalten kann, mussten die Suspensionen dann möglichst rasch in für das Einfrieren erforderliche Schraubdeckelgefäße (Kryovials, Nalgene) überführt werden.

Das Einfrieren der Zellen wurde in zwei Phasen vollzogen. Zuerst erfolgte das Einfrieren bei – 20 °C in einem Kryobehälter (Invitrogen). In diesem Behälter sind die Schraubdeckelgefäße in einem Plastikeinsatz, der in Isopropanol schwimmt. Das Isopropanol gewährleistet, dass das Einfrieren mit einer Geschwindigkeit von 1°C/h vollzogen wird. Die Zellsuspensionen verbleiben mindestens über Nacht bis zu 48 h bei – 20°C. Abschließend werden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleotid-Fragmente wie z. B. PCR-Produkte bzw. Präparationen von Gesamt-RNA wurden mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Trennungen erfolgten je nach Größe der Nukleinsäure-Fragmente mit 1,0 bis 1,5% (w/v) Agarose-Gelen. Die Agarose (NEEO Ultra-Qualität, Roth) wurde nach dem Einwiegen mit TBE -Puffer versetzt und anschließend in einem Mikrowellengerät aufgeköcht. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurde nach kurzem Abkühlen Ethidiumbromid hinzugefügt (0,5 µg Ethidiumbromid/ ml Agarosegel). Die Gele konnten sofort nach vollständiger Polymerisation eingesetzt werden. Proben wurden vor dem Auftragen mit Ladepuffer versetzt (1:2). Die Elektrophorese erfolgte dann in TBE-Puffer bei 5 V/cm in einer Elektrophorese-Kammer (Mini Sub Cell GT, Biorad). Nach ca. 35 – 45 min wurden die Nukleotid-Fragmente mit UV-Licht (Multiimage Lightcabinet Biozym) detektiert und mit dem Alphaimager 1220 dokumentiert. Das in die Nukleotidstränge interkalierte Ethidiumbromid fluoresziert nach Anregung durch UV-Licht. Zur Bestimmung der Größe der Nukleotid-Fragmente wurden bei jeder Auftrennung eine 100 bp oder 1 kb – Leiter aufgetragen.

TBE-Puffer		Ladepuffer	
Tris (Base)	90 mM	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
Borsäure	90 mM	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
EDTA	2 mM	Ficoll 400	25,0 % (w/v)
		EDTA	50 mM



## 2.6.2 Nukleinsäure - Isolierung

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus Raupen und Einzelgeweben der Raupen (Fettkörper u. a.) wurden sowohl frische Tiere nach Betäubung als auch Material, welches bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde, eingesetzt. Die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  war ohne Probleme für ein halbes Jahr möglich. Bei deutlich darüber hinaus gehenden Lagerzeiten konnte jedoch häufig eine Abnahme der RNA-Qualität beobachtet werden. Die Aufarbeitung und Gewinnung der Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Geweben durchgeführt. Das Zerkleinern der Raupen bzw. von Geweben erfolgte mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser, so dass für die weitere Aufarbeitung nach Herstellerangaben ein gekühltes Pulver vorlag. Die Kühlung ist essentiell, um eine Degradierung der RNA zu vermeiden. Der Aufschluss und die Homogenisierung des Pulvers erfolgte mit dem Qiashredder in einem Puffer, der Guanidinisothiocyanat als RNase-Inhibitor enthielt. Für die Isolierung und Reinigung der RNA wurden Zentrifugationssäulen eingesetzt, welche eine Silica-Membran aufweisen. Diese bindet RNA mit einer Länge von mindestens 200 bp bis zu einer Menge von 100 µg. Größere RNA-Moleküle werden so angereichert. Die Elution erfolgte mit 50 µl RNase-freiem Wasser, welches durch Inkubation mit Dimethylpyrocarbonat (DMPC) hergestellt wurde (s. u. DMPC-Wasser).

### QUANTIFIZIERUNG DER (GESAMT-) RNA

Die Präparation der Gesamt-RNA wurde 1:50 mit DMPC-Wasser verdünnt und spektrophotometrisch mit dem Ultrospec 3100 Pro Photometer (Amersham Pharmacia) bei 260 und 280 nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) vermessen. Die Konzentration der RNA lässt sich wie folgt berechnen:

$$\text{Massenkonzentration} [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$A_{260}$       Absorption bei 260 nm

Die Reinheit der RNA-Präparation lässt sich durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm beschreiben. Hierbei werden nur die UV-absorbierenden Verunreinigungen erfasst. Der Quotient für reine RNA beträgt 1,9 – 2,1. Die RNA-Präparationen wurden parallel elektrophoretisch auf Degradierung der RNA untersucht (Kap. 2.6.1).

### DMPC-WASSER

Für die Herstellung von RNase freiem Wasser wurden für je 200 ml Gesamtansatz 160 µl Dimethyl-dicarbonat (**Dimethylpyrocarbonat**, DMPC) in einer Mischung von je 10 ml absolutem Ethanol und demineralisiertem Wasser gelöst. Das Volumen entspricht einer DMPC-Masse von

0,2 g in 200 ml ( $\rho(20^{\circ}\text{C}) = 1,245 \text{ g/ml}$ ). Die Mischung aus DMPC, Wasser und Ethanol wird mit Wasser auf 200 ml aufgefüllt und zur Inaktivierung der RNasen bei  $+37^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Das überschüssige DMPC wird durch Autoklavieren quantitativ inaktiviert.

### 2.6.3 cDNA-Synthese

Die Transkription von mRNA in cDNA (copy DNA) mittels Reversen Transkriptasen erfolgte, um Matrizen für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) zu erhalten. Hierfür wurden die Präparationen der Gesamt-RNA (Kap. 2.6.2) verwendet. Bei den Reversen transkriptasen handelt es sich um RNA-abhängige DNA-Polymerasen, die nach Anlagerung eines Primers an die RNA eine zu dieser komplementäre cDNA synthetisieren. Durch die Verwendung des oligo(dT)-Primers (Kap. 2.4) in der reversen Transkription, der sich an den Poly-A-Schwanz der mRNA-Moleküle (messenger RNA) anlagerte, wurde aus mRNA die entsprechende cDNA synthetisiert.

#### ANSATZ

oligo(dT)-Primer mit 2 pmol/μl	2,5 μl
(für 5'-RACE GSP1 [Kap. 2.6.4.3] mit 2 pmol/μl)	1,0 μl)
GesamtRNA	1,0 μg
dNTP (jedes 10 mM)	1,0 μl
DMPC-Wasser	ad 14,0 μl

Um Sekundärstrukturen der RNA vor der RT-Reaktion aufzutrennen erfolgte eine Inkubation bei +65°C für 5 min.

5 x First Strand Buffer (Invitrogen)	4,0 μl
DTT 0,1 M (Invitrogen)	1,0 μl
Superscript III (Invitrogen)	1,0 μl

Die Synthese der cDNA erfolgte bei 50 – 55 °C für 60 min. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei +70°C für 15 min.

cDNA, die eingesetzt wurde, um noch nicht bekannte DNA-Sequenzen mit degenerierten Primern zu amplifizieren, und cDNA, die bei der Vervollständigung von Sequenzen mit der 5' RACE verwendet wurde, wurden noch einem Abbau der RNA durch je 0,5 μl RNase H und RNase T2 unterworfen. Die Inkubation erfolgte bei +37°C für 20 min. Danach konnte die cDNA sofort eingesetzt oder dauerhaft bei – 20°C gelagert werden.

### 2.6.4 PCR-Methoden

#### 2.6.4.1 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, um die DNA-Abschnitte zwischen zwei bestimmten Primer-Bindungsstellen (cDNA, Plasmide u.a.) exponentiell zu vervielfältigen. Hierfür werden thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt. Die *Taq*-DNA-Polymerase (*Thermus aquaticus*) wurde für die PCR mit degenerierten Primern, für RACE-Techniken (Kap. 2.6.4.3) und für die RT-PCR (Kap. 2.6.4.4) verwendet. Neben der Matrizen-abhängigen Polymerase-Aktivität verfügt die *Taq*-DNA-Polymerase über die Matrizen-unabhängige Eigenschaft an jedes 3'-Ende ein zusätzliches Adenosin anzufügen (A-Überhang). Die PCR-Produkte mit Adenosinüberhang konnten mit dem TOPO-TA-Cloning Kit kloniert werden (Kap. 2.6.5).

Für die Klonierung von Expressionskonstrukten wurde die *Pfx*-DNA-Polymerase eingesetzt, die neben der 5'3'-DNA-Exonukleaseaktivität im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase noch über eine

3'5'-Exonukleaseaktivität verfügt. Die *Pfx*-DNA-Polymerase ist somit zur Korrektur von falsch eingebauten Nukleotiden in der Lage, so dass die PCR-Produkte eine geringere Fehlerhäufigkeit haben ("proof reading"-Aktivität). Für die Proteinexpression wurden deshalb nur Klone mit *Pfx*-amplifizierten Zielensequenzen eingesetzt. Damit DNA-Polymerasen in einer PCR durch Primer bestimmte DNA-Abschnitte exponentiell vervielfältigen können, müssen mehrere Arbeitsschritte nacheinander vollzogen werden. Diese werden durch ein Temperaturprogramm in einer PCR-Maschine kontinuierlich durchlaufen. Hierbei unterscheidet man:

Eine initiale Phase in der die Nukleinsäurenpaarungen, die durch einen komplementären Strang oder durch Paarung von nicht komplementären DNA-Sequenzen unspezifisch bestehen, getrennt werden. Das Aufschmelzen erfolgte üblicherweise bei + 94°C.

Die Annealingphase, in der die Primer bzw. komplementäre DNA Stränge wieder hybridisieren können. Die hierfür erforderliche Temperatur wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst und muss empirisch ermittelt werden. Einer dieser Faktoren ist die Schmelztemperatur der Primer, welche die Temperaturangibt, bei der die Primer zu 50 % an den DNA-Strang gebunden vorliegen. Da die Schmelztemperaturen beider Primer in aller Regel nicht gleich sind, muss ein Kompromiss für eine gute Amplifizierung gefunden werden. Darüber hinaus beeinflusst das zu vervielfältigende Fragment (neben den vorgegebenen Bedingungen wie Pufferzusammensetzung u. a.) die optimale Annealingtemperatur, so dass die Schmelztemperatur der Primer nur eine Orientierungshilfe sein kann.

Für die Elongationsphase wird eine Temperatur gewählt, in der die DNA-Polymerase ihre Aktivität entfalten kann. In der Elongationsphase werden die Primer anhand der vorliegenden DNA-Matrize in 3' Richtung verlängert. Für die *Taq*-DNA-Polymerase betrug die Elongationstemperatur standardmäßig +72°C und für die *Pfx*-DNA-Polymerase +68°C oder +72°C.

Die verschiedenen Phasen wurden mit unterschiedlichen Zeit- und Temperaturkombinationen mit 35 – 40 Zyklen durchlaufen. Dem schloss sich dann noch eine letzte Elongationszeit für 10 min an, die der Vervollständigung der Amplifikate diente. Trotz aller Variationen wurde üblicherweise folgender Ansatz mit der *Taq*-DNA-Polymerase gewählt:

#### ANSATZ

Forward-Primer 10 pmol/µl (1 pmol/ µl Ansatz)	2,50 µl
Reverse-Primer 10 pmol/µl (1 pmol/ µl Ansatz)	2,50 µl
Wasser	9,00 µl
DNA-Lösung	1,00 µl
<hr/>	
10 x PCR Puffer (Invitrogen)	2,50 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM (Invitrogen)	0,75 µl
dNTP jedes mit 10 mM	0,50 µl
Wasser	6,125 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl
	Σ 25 µl

Die PCR erfolgte dann in einem Personalcycler (Eppendorf) oder im Mastercycler (Eppendorf), wobei letzterer die Möglichkeit eines Temperaturgradienten bot. Schwierige Amplifikate konnten mit einem sogenannten "Touchdown-Programm" erhalten werden. Hierbei wurde eine bestimmte Hybridisierungstemperatur (Annealingtemperatur) im ersten Zyklus gewählt, die üblicherweise oberhalb der berechneten Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer liegt. Im PCR-Verlauf wird die Hybridisierungstemperatur dann sukzessiv um  $-0,5^{\circ}\text{C}$  auf eine Temperatur verringert (s. o.), die unterhalb der Schmelztemperaturen der Primer liegt. Der zweite Teil des Temperaturprogramms erfolgt dann bei der letzten Hybridisierungstemperatur für weitere 5 – 20 Zyklen. Mit dieser Methodik können bei der Auswahl geeigneter (Temperatur-) Bedingungen mehr Amplifikate erzielt werden, da die Artfaktbildung und das Entstehen von Primerdimeren verringert wird (Newton, 1994). Geeignete Bedingungen (Temperaturintervall, Zyklenanzahl) mussten auch hier empirisch ermittelt werden. Die PCR-Ansätze wurden nach dem Temperaturprogramm bis zur Auswertung durch Gelelektrophorese (Kap. 2.6.1) bei  $+15^{\circ}\text{C}$  in dem PCR-Cycler (gekennzeichnet im Temperaturprogramm als „ $\infty$ “) oder bei  $+4^{\circ}\text{C}$  gelagert und innerhalb von höchstens 12 Stunden für weitere Reaktionen verwendet.

#### 2.6.4.2 Sequenzsuche mit degenerierten Primern

Um mit der PCR cDNA-Klone eines erwünschten Proteins zu gewinnen, sind nach den DNA-Sequenzen, die für das gesuchte Protein codieren, spezifische Primer zu konstruieren. Liegen diese Sequenz-Informationen nicht vor, so können mit Hilfe von degenerierten Primern trotzdem die gesuchten cDNA-Klone gewonnen werden. Zur Konstruktion von degenerierten Primern wurde eine Auswahl bereits bekannter Sequenzen anderer möglichst nah verwandter Arten auf Aminosäureebene miteinander verglichen und degenerierte Primer in Auftrag gegeben (Kap. 2.4, Kap. 3.3.1).

Um die Ausbeute der PCR-Produkte in PCR-Ansätzen mit degenerierten Primern für die Klonierungen zu erhöhen, wurden zur Isolierung der Flavin-abhängigen Monooxygenasen die Technik der SEMI-NESTED- bzw. NESTED-PCR eingesetzt. Hierbei wird im ersten Schritt wie bei anderen PCR-Ansätzen (Kap. 2.6.4.1) eine PCR mit einem Forward- und einem Reverse-Primer durchgeführt. Degenerierte und spezifische Primer wurden in einer Konzentration von  $1\text{ }\mu\text{M}$  verwendet. Bei Verwendung des Oligo (dT)-Primers wurde dieser in einer Konzentration von  $100\text{ nM}$  eingesetzt ( $2,5\text{ pmol}/25\text{ }\mu\text{l}$ ), da vermehrt Fragmente durch unspezifische Bindung des Oligo (dT)-Primers an cDNA erzeugt wurden. Die durch die erste PCR erhaltene Lösung von PCR-Produkten wurde 1:100 mit einem  $10\text{ mM}$  Tris/ HCl-Puffer  $\text{pH}=8$  verdünnt, so dass die eingesetzten Primer für eine nachfolgende PCR in einer Konzentration vorlagen, die keine unspezifischen Amplifikate in größerer Menge auftreten ließen. Für die zweite PCR wurden Primer verwendet, die jeweils weiter innerhalb der gesuchten Sequenz lagen. Zum einen wurde so die Amplifikatausbeute erhöht, zum anderen die Spezifität, da die amplifizierten Sequenzen mehrere zu den eingesetzten Primern passende Sequenz-Motive haben mussten. Werden bei der zweiten PCR neue Primer eingesetzt, die weiter innerhalb der Sequenz liegen, so spricht man von einer Nested- und bei Austausch von nur einem Primer von einer Semi-Nested-PCR.

#### 2.6.4.3 Schnelle Amplifizierung von cDNA Enden (RACE)

Zur Vervollständigung von internen Sequenzabschnitten von cDNA wurden die Methoden der schnellen Amplifizierung von cDNA Enden (RACE) verwendet.

### 5'-RACE

Für die Komplettierung von Sequenz-internen DNA-Fragmenten mit dem jeweiligen 5'-Ende wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA mit einem genspezifischen Primer (GSP1) in cDNA umgeschrieben und anschließend die RNA abgebaut (Kap. 2.6.3). Die so erhaltene cDNA-Lösung wurde mit dem NucleoSpin® Extract Kit nach Herstellerprotokoll gereinigt. Damit die Amplifizierung des noch nicht bekannten genspezifischen 5'-Endes mit der PCR erfolgen konnte, musste am 5'-Ende eine Sequenz angefügt werden, gegen die dann ein Forward-Primer eingesetzt wurde. Dies wurde mit der Terminalen Desoxynukleotidyltransferase (Invitrogen) erreicht, die unspezifisch Nukleotide an das 5'-Ende von DNA-Fragmenten anfügen kann (Tailing). Durch Zugabe nur eines Nukleotids wie Cytidintriphosphat wurde somit eine Polycytidin-Sequenzen angefügt.

### TAILINGANSATZ

5 x Tailingpuffer	5,0 µl
dCTP	2,5 µl
Gereinigte cDNA	10,0 µl
DMPC-Wasser	6,5 µl

Der Ansatz wurde zuerst für 2 -3 min bei 94°C, dann 2 min bei + 65°C und vor Zugabe der Transferase noch 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Terminale Desoxynukleotidyltransferase (Invitrogen)	1,0 µl
---	--------

Das Tailing erfolgte innerhalb von 10 min bei + 37°C. Danach wurde die Transferase 10 min bei + 65°C inaktiviert. Die resultierende cDNA konnte sofort in einer PCR eingesetzt oder dauerhaft bei – 20°C gelagert werden. Zur Amplifizierung des 5'-Endes wurde die PCR als Semi-Nested-PCR in zwei Stufen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde der zweite genspezifische Primer (GSP2) als Reverse Primer und ein Ankerprimer (AAP, Abridged Anchor Primer), der eine zu der angefügten Polycytidinsequenz komplementäre Sequenz hat, als Forward-Primer eingesetzt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde 1:100 verdünnt und in einer zweiten PCR mit dem GSP3 und dem Ankerprimer (AAP) in einem Semi-Nested Verfahren (S. 24) eingesetzt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit dem TOPO-TA-Cloning Kit kloniert (Kap. 2.6.5).

### 3'-RACE

Für die 3'-RACE wurde 1 µg Gesamt-RNA mit dem oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.6.3). Die Vervollständigung der Sequenzen mit dem 3' Ende erfolgte dann als einfache PCR mit einem spezifischen Primer als Forward-Primer und dem oligo(dT)-Primer als Reverse-Primer. Die erhaltenen DNA-Fragmente der RACE-Techniken wurden mit dem TOPO-TA-Cloning Kit kloniert (Kap. 2.6.5) und für die Sequenzierungen verwendet.

#### 2.6.4.4 RT-PCR

Gewebespezifische Expressionsmuster wurden mit der RT-PCR durch den Nachweis spezifischer Transkripte untersucht (Kap. 3.7). Aus den zu untersuchenden Geweben wurde Gesamt-RNA mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit isoliert (Kap. 2.6.2). Für die Synthese von cDNA wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt und mit 10 pmol des oligo(dT)-Primers umgeschrieben (Kap. 2.6.3). In der anschließenden PCR (Kap. 2.6.4.1) wurden jeweils 2 µl für einen 50 µl Ansatz der so hergestellten cDNA-Lösung eingesetzt.

Als Positivkontrolle diente ein Plasmid, welches die cDNA eines kontrollsequenzierten Expressionsklons enthielt (Kap. 3.6.1.2). Ein PCR-Ansatz erhielt statt cDNA ein äquivalentes Volumen Wasser (Kap. 2.1) und diente als Negativkontrolle. Die PCR erfolgte mit einem 50 µl Ansatz, dem nach 16, 19, 22, und 25 Zyklen jeweils eine Probe von 4 µl entnommen wurde. Die Proben wurden mit einem 1,5 % Agarose-Gel elektrophoretisch ausgewertet (Kap. 2.6.1).

### 2.6.5 TOPO-TA-Cloning

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das TOPO-TA-Cloning Kit von der Fa. Invitrogen verwendet. Voraussetzung für die Verwendung des Kits ist der Einsatz einer *Taq*-DNA-Polymerase, die aufgrund ihrer Transferaseaktivität an PCR-Produkte einen einzelnen Adeninüberhang am 3' Ende erzeugt. Diese sind dann komplementär zum bereits linearisierten pCR2.1 TOPO-Vektor (Kap. 2.3), der einen Thymidinüberhang an jedem 3' Ende hat (Thymidin-Adenin – Cloning). Über den Phosphatrest des Thymidinüberhangs ist die Topoisomerase 1 kovalent an den Vektor gebunden. Die Topoisomerase 1 katalysiert die Ligation in einem Schritt.

Vor der Ligation wurden die PCR-Produkte durch eine Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.6.1) gereinigt. Hierfür wurde eine niedrig schmelzende Agarose (Low-melting) eingesetzt. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden die Ansätze nach der Ligation mit 8 µl auf +37°C vorgewärmtem Wasser im Reaktionsgefäß gemischt. Alle weiteren Bearbeitungsschritte erfolgten nach Herstellerprotokoll. Die fertigen Transformationsansätze wurden auf frisch mit 100 µg/ml Ampicillin und X-Gal 80 µg/ml vorbereiteten LB-Agarplatten ausgestrichen. Das Wachstum der transformierten Klone erfolgte bei + 37°C über Nacht. Die Klone konnten dann bei + 4°C gelagert und 7 -10 Tage ohne Probleme verwendet werden.

#### IDENTIFIZIERUNG POSITIVER KLONE

Der Farbstoff X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranosid) ist eine Verbindung, die durch die β-Galactosidase in einen blauen Farbstoff überführt wird. Der pCR®2.1-TOPO®-Vektor (Kap. 2.3) verfügt über eine DNA-Sequenz in der Multi-Cloning-Site, die für die carboxyterminale Untereinheit der β-Galactosidase codiert. Wird eine cDNA in die Multi-Cloning-Site eingefügt, so wird der Leserahmender für die Untereinheit codierenden Sequenz unterbrochen und das Enzym kann nicht mehr funktionell exprimiert werden. Die positiven Klone fallen deshalb durch ihre Farblosigkeit auf. Im Gegensatz hierzu wird die β-Galactosidase bei Klonen funktionell exprimiert, deren Vektoren ohne PCR-Produkt verblieben sind und wieder miteinander ligiert wurden. Diese können durch ihre blaue Farbe von den positiven Klonen unterschieden werden. Die farblosen Klone wurden nach Vermehrung und Isolierung der Plasmide durch Restriktionsanalysen (Kap. 2.6.6) auf Vorhandensein der Fremd-DNA kontrolliert.

### 2.6.6 Restriktionen

Doppelsträngige DNA kann mit Restriktionsenzymen, die eine spezifische Hydrolysereaktion katalysieren, in definierte Fragmente geschnitten werden. Hierfür wurden bakterielle Restriktionsendonukleasen der Klasse 2 verwendet, die in doppelsträngiger DNA spezifische Sequenzen, sogenannte Palindrome, erkennen und hydrolysieren. Die bakteriellen Restriktionsendonukleasen wurden eingesetzt, um Vektoren zu linearisieren und PCR-Produkte für Ligationen in einen Vektor vorzubereiten. Nach Klonierungsreaktionen konnten mit einer Restriktionsanalyse unterschiedliche Klone differenziert werden. Die Klonierungsprodukte des TOPO-TA-Clonings (Kap. 2.6.5) wurden vorzugsweise mit dem Restriktionsenzym EcoRI

geschnitten, da dieses Enzym jeweils über eine Restriktionsschnittstelle direkt vor und nach der eingefügten Zielsequenz im Vektor verfügt. Diese ermöglichen ein Herauslösen des PCR-Produktes aus dem Vektor, so dass positive Klonierungsprodukte aufgrund ihrer Größe identifiziert werden konnten.

	Restriktionsanalysen	Klonierungen
DNA	3 µl (Plasmidpräparation)	1,5- 2,2 µg
Restriktionsenzym(e)	5 – 10 U	5 - 50 U
10 x Puffer	0,4 µl	1-5 µl
H <sub>2</sub> O <sup>A</sup>	ad 4,0 µl	ad 10-50 µl
A (Kap. 2.1)		

Die Inkubationen erfolgten in dem Puffer in dem das oder die Enzyme eine maximale Aktivität haben. Restriktionsanalysen wurden für 60 – 90 min inkubiert.

### 2.6.7 Ligationen

Die vollständigen Restriktionsansätze (Kap. 2.6.6) wurden mit einem Low-melt-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die zu ligierenden DNA-Fragmente nach Detektion unter UV-Licht ausgeschnitten und vereint. Die Reinigung und Elution aus dem Gel wurde mit dem NucleoSpin Extract Kit nach Hersteller-Protokoll (Macherey & Nagel) ausgeführt. Von den gereinigten Eluaten wurden je eine 2 µl Probe und von einer 1:5 Verdünnung je eine 2 µl Probe mit 4 µl Ladepuffer gemischt und elektrophoretisch untersucht (Kap. 2.6.1). Nach Auftrennung konnten die Mengen bzw. die Verhältnisse von Vektor und PCR-Produkt für die Ligation optisch abgeschätzt werden.

#### LIGATIONSANSÄTZE FÜR DEN LIGATIONEN MIT DEM VEKTOR pQE60

(Gereinigte) PCR-Lösung	1,0 – 4,0 µl
Vektor pQE60	0,5 – 2,0 µl
T4-DNA-Ligase	0,5 µl
5 x Ligasepuffer	2,0 µl
H <sub>2</sub> O (Kap. 2.1)	ad 10,0 µl

Die Ansätze wurden bei + 22°C für 5 – 6 Stunden inkubiert. Nach Inaktivierung der T4-DNA-Ligase 10 min bei + 70°C wurden die Ligationsansätze sofort eingesetzt oder bei – 20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

#### LIGATIONSANSÄTZE FÜR LIGATIONEN MIT DEM VEKTOR pET3a

Die einzusetzenden DNA Mengen wurden nach optischer Abschätzung mit einem Agarosegel (Kap. 2.6.1) auf 10 Teile gereinigtes PCR-Produkt zu einem Teil gereinigten Vektor festgesetzt.

(Gereinigtes) PCR-Produkt	3,0 µl
Vektor pET3a	0,5 µl
5 x Ligasepuffer	2,0 µl
H <sub>2</sub> O (Kap. 2.1)	ad 9,5 µl

Der Ansatz wurde für 2 min bei + 55°C und dann für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde von der T4-DNA-Ligase Lösung ein Volumen von 0,5 µl hinzugefügt und für 1 Stunde bei 25°C inkubiert. Nach Inaktivierung der T4-DNA-Ligase 10 min bei + 70°C wurden die Ligationsansätze sofort eingesetzt oder bei – 20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 2.6.8 Herstellung kompetenter Zellen

Die für Transformationen notwendige Fähigkeit (Kompetenz) Plasmide aufnehmen zu können, erhalten *E. coli*-Zellen erst nach einer Vorbehandlung. Sie wurden durch die Methode nach Cohen et. al. (1972) mit kleinen Modifikationen kompetent gemacht. Der jeweilige *E. coli* Stamm wurde in LB-Medium in Vorkultur bei + 37°C genommen. Ein Aliquot von 500 µl wurde zum Animpfen von 50 ml LB-Medium verwendet. Nach Erreichen einer Optischen Dichte von 0,4 - 0,5 (OD<sub>600nm</sub>) wurde die Suspension 10 min auf Eis abgekühlt. Durch Zentrifugation (bei + 4°C, 10 min, 3000 Upm, Beckmann, GS-6R) wurde der Überstand abgetrennt und dann entfernt. Die Zellen wurden in einem halben Kulturvolumen vorgekühlter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und nach 10 min auf Eis zentrifugiert (s. o.). Die Zellen wurden dann in 1/10 Kulturvolumen 0,1 M CaCl<sub>2</sub> mit 15 % Glycerin resuspendiert und bei + 4°C für 12 – 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die kompetenten Zellen in Schraubdeckelgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung konnten die kompetenten Zellen bei – 80°C für mindestens 6 Monate gelagert werden.

### 2.6.9 Transformation

Zur Vermehrung von Vektor-Konstrukten oder für die Expression wurden Plasmide in unterschiedliche *E. coli*-Stämme eingeschleust (Transformation). Für die Vermehrung von Vektoren wurden TOP10, DH5α und XL1 Blue eingesetzt (Kap. 2.5.2.1). Die zu transformierenden, kompetenten *E. coli* (Kap. 2.6.9) wurden kurz der Verwendung auf Eis aufgetaut. Je Transformationsansatz wurden 25 – 50 µl Bakteriensuspension mit 0,5 - 3 µl bzw. 75 – 250 ng Plasmidlösung versetzt. Dieser Ansatz wurde 30 – 35 min auf Eis inkubiert. Bei + 42°C schloss sich für 35 – 55 sec ein Hitzeschock an. Sofort danach wurde der Ansatz wieder auf Eis für 5 - 10 min gekühlt. Nach Zugabe von 150 – 250 µl SOC-Medium wurde der Ansatz bei + 37°C und 230 Upm für 55 – 75 min inkubiert. Zur Selektion der erfolgreich transformierten *E. coli*-Zellen wurden ca. 5-10 min vorher LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ergänzt (Kap. 2.3, Kap. 2.5.2.1 und Kap. 2.5.2.2). Der Transformationsansatz wurde dann auf den vorbereiteten LB-Agarplatten ausplattiert und ca. 15 Stunden bei + 37°C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung konnten die so entstandenen Klone auf der Agarplatte ohne Probleme bei + 4°C für 7 – 10 Tage gelagert werden.

SOC-Medium (Sambrook et al., 1989)

Trypton	2,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM <sup>B</sup>
MgSO <sub>4</sub>	10 mM <sup>B</sup>
Glucose	20 mM <sup>B</sup>

auf pH 7,5 mit NaOH eingestellt.

<sup>B</sup> Diese Lösungen wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren dem Medium zugesetzt.



### 2.6.10 Plasmidisolierung

Zur Vervielfältigung von Vektorkonstrukten wurden transformierte *E. coli* Klone in einer Übernachtskultur vermehrt. Die Isolierung erfolgte mit einem alkalischen Zellaufschluss und Ausfällung der Plasmide. Hierfür wurden die Zellen von 1,5 ml der Übernachtskultur aufgearbeitet. Das Zellpellet wurde in 200 µl der Lösung 1 resuspendiert und auf Eis gekühlt. Die alkalische Lyse der Zellen wurde durch Zugabe von 400 µl frisch angesetzter Lösung 2 für genau 5 min unter Kühlung durchgeführt. Die Zeitvorgabe muss eingehalten werden, da ein Unterschreiten zu einem nicht vollständigem Aufschluss und ein Überschreiten zu einem Denaturieren der Plasmid-DNA führt. Durch Zugabe von 300 µl 7,5 M Ammoniumacetatlösung wurde die alkalische Lyse beendet und die genomische DNA sowie Proteine ausgefällt. Die Fällung erfolgte für 15 min auf Eis. Die entstandenen Präzipitate wurden durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge fresca oder Eppendorf Minispin plus) 15 min mit 13 500 Upm vom Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgesäß, welches 850 µl Isopropanol enthielt, überführt. Die alkoholische Plasmidfällung erfolgte mindestens 20 min bei Raumtemperatur. Nachfolgend konnte das Plasmid durch Zentrifugation mit 15 000 Upm für 12 min separiert werden. Der Überstand wurde abgenommen und das Plasmidpellet mit 500 µl einer 70% Ethanollösung gewaschen. Zur Entfernung der restlichen Ethanollösung wurde das Plasmidpellet bei + 37°C inkubiert. Hierbei musste ein vollständiges Austrocknen jedoch vermieden werden, da eingetrocknete Plasmide schlecht wieder gelöst werden konnten. Die Plasmide wurden in 50 µl Tris/HCl-Puffer mit pH= 8 gelöst. Der Plasmidlösung wurden 0,5 µl einer RNase A Lösung (DNase-frei 500 µg/µl, Roche) zugefügt und diese bei + 37° für 30 min inkubiert. So wurden mögliche RNA-Verunreinigungen abgebaut. Die erhaltenen Plasmidlösungen konnten sofort einer Restriktionskontrolle unterworfen oder dauerhaft bei – 20°C gelagert werden.

Für Sequenzierungen wurden Zellen von 4 -5 ml einer Übernachtskultur mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll aufgearbeitet. Die so erhaltenen Plasmidlösungen weisen eine höhere Reinheit auf und können problemlos sequenziert werden. Um Plasmide in größerer Menge zu isolieren, wurden im Laufe dieser Arbeit zwei verschiedene Midiprep Kits eingesetzt. Hierfür wurden 50 ml Übernachtskulturen entweder mit dem Pure YIELD™ Plasmid Midiprep Kit nach dem Herstellerprotokoll (mit Vakuum) oder mit dem GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich) nach Herstellerprotokoll aufgearbeitet.

#### Lösung 1

50 mM Glucose  
25 mM Tris-Base  
10 mM EDTA  
pH 8,0

#### Lösung 2

0,2 N NaOH  
1 % SDS (w/v)  
Vor Gebrauch frisch angesetzt

### 2.6.11 Sequenzanalyse

Für Sequenzierungen von DNA-Sequenzen wurden 1,5 µg einer Plasmidlösung, die mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel) isoliert wurden, in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur eingetrocknet. Die Sequenzierung wurde von der Fa. MWG Biotech ausgeführt.

Die Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen erfolgte mit einer Reihe von Computerprogrammen, die auf folgenden Servern zur Verfügung standen:

Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung Göttingen (GWDG: <http://www.gwdg.de>)

Auf diesem Server wurde das GCG-Programmpaket (Wisconsin Computer Group) genutzt. Mit Programmen dieses Paketes konnten Nukleinsäure- und Proteinsequenzen analysiert und verglichen werden.

National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Die BLAST-Auswertung erlaubte den Vergleich von DNA- oder Proteinsequenzen aus verschiedenen Datenbanken.

Center for Biological Sequence Analysis (CBS: <http://www.cbs.dtu.dk>). Zur Vorhersage verschiedener Sequenzeigenschaften wurden folgende Programme verwendet: SignalP 3.0 (Signalsequenz), TargetP 1.1 (Subzelluläre Distribution/Translokation), TatP 1.0 (Tat-Signal), NetOGlyc 3.1 (O-Glykosylierungsstellen), ProtFun 2.2 (Funktionsanalyse), NetNGlyc 1.0 (N-Glykosylierungsstellen). Die Darstellung der Nukleinsäure- und Proteinsequenzen in dieser Arbeit als alternierende Abfolge von Nuklein- und Proteinsequenzen erfolgte mit dem dort erhältlichen Programm SEQtools 8.2.102.

Auf der Internetseite <http://www.expasy.org> wird die Software protparam zur Verfügung gestellt mit der Proteineigenschaften wie Isoelektrischer Punkt und Molekularmasse vorhergesagt werden können.

Auf der Internetseite <http://www.evolution.genetics.washington.edu> wird das PHYLIP Software Paket V 3.68 zur Verfügung gestellt. Für die phylogenetische Analyse mit der „Maximum likelihood“-Methode wurden die Software-Module „seqboot“, „proml“ und „consense“ eingesetzt.

## 2.7 Heterologe Genexpression in Insektenzellen

### 2.7.1 Im Insektenzellsystem eingesetzte Klonierungskonstrukte

#### TMSHT6      Tyria mit Signal und HIS Tag Klon 6

Für die Expression im Insektenzellsystem mit Baculoviren wurde die SNO von *T. jacobaeae* in den Vektor pFASTBAC 1 kloniert (Kap. 2.3) und durch seitenspezifische Transposition in einen BACMID-Vektor übertragen. Die für die rekombinante SNO (rSNO) von *T. jacobaeae* codierende cDNA-Sequenz wurde durch Anfügen einer Nukleinsäure-Sequenz an den Reverse-Primer ergänzt, so dass das exprimierte Protein über eine C-terminale Sequenz von sechs Aminosäuren Histidin verfügt (Naumann, 2003). Die rekombinanten Proteine konnten deshalb durch eine Affinitätschromatographie gereinigt werden. Das PCR-Produkt wies die native Signalsequenz auf, so dass sie ins Medium abgegeben wird (Naumann, 2003).

#### TMSK-HIS              Tyria mit Signal Konstitutives System mit His-Tag

Zur Erzeugung einer stabilen Sf9-Zelllinie, die kontinuierlich die rSNO exprimiert, wurde die cDNA der SNO von *T. jacobaeae* in den Vektor pIB/V5 kloniert (Kap. 2.3, Naumann, 2003). Erfolgreich transfizierte (Insekten-) Zellen verfügen über den Vektor über eine Blastizidinresistenz. Die Selektion mit Blasicidin führt zu stabilen Zelllinien, die konstitutiv (klonierte) Proteine exprimieren. Diese verfügen über eine C-terminale Sequenz von sechs Aminosäuren Histidin, die eine Affinitätschromatographie ermöglicht.

#### TMSK-KOZ HT      Tyria mit Signal Konstitutives System mit Kozak-Sequenz und His-Tag

Vektor bzw. Vektorkonstrukt wie TMSK-HIS (s. o.). Abweichend davon wurde vor der Zielsequenz am 5'-Ende die zusätzliche Sequenz (G/A)NN ATG G (N jede beliebige Base) eingefügt. Um Leserahmenverschiebungen zu vermeiden wurde das letzte Guanin mit Guanin und Adenin (Glycin) ergänzt (Naumann, 2003). Die nach Kozak (Kozak, 1987, 1997) benannte Sequenz ist eine Translations-Initiations-Sequenz, mit der die Effizienz, das erste AUG-Codon eukaryontischer mRNA's als Start zu erkennen, verbessert wird.

### 2.7.2 Virustiterbestimmung

Die Expressionsausbeute von rekombinanten Proteinen, die mit Baculoviren in Sf9-Zellen exprimiert werden, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Einer dieser Faktoren ist das Verhältnis von Insektenzellen zu angeimpften Baculoviren. Für die quantitative Bestimmung der Baculoviren wurde eine Virustiterbestimmung als Plaque test durchgeführt, der eine Bestimmung der vermehrungsfähigen Viren (als plaque forming units, pfu) ermöglicht. Die Virusproben wurden mit einer dekadischen Reihenverdünnung von  $10^{-1}$  -  $10^{-9}$  in TC100 + 10 % FBS vorbereitet und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Für die Aussaat der Zellen als einzelne Zellschicht wurden Sf9-Zellen einer 3 Tage wachsenden Suspensionkultur verwendet, um eine Zellpopulation einzusetzen, die sich in der Exponentiellen Wachstumsphase befindet. Nach Einstellen der Zellsuspension auf  $0,5 - 2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml TC100 + 10 % FBS wurde jeweils eine Fläche von  $9,03 \text{ cm}^2$  einer Zellkultur Testplatte 6 (Flachbodenschale) mit  $1 \cdot 10^6$  Zellen beschichtet. Die Zeitspanne für die

Adhäsion betrug 60 - 75 min. Die adhärenierten Zellen wurden mit je 250 µl einer Verdünnung der Virusprobe für 60 - 80 min inkubiert, so dass eine Anzahl von Zellen in Abhängigkeit von der Viruskonzentration infiziert wurden. Nach Entfernen des Virusüberstands wurden die Zellen mit 2 ml einer Mischung gleicher Volumina 3 % Agaroselösung und doppeltkonzentriertem TC100 (Herstellprotokoll Invitrogen) + 10 % FBS und 10 µl DEAE-Dextran (pro ml Mischung) überschichtet. Die Zellen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die weitere Inkubation erfolgte für 6 - 8 Tage bei + 27°C.

Durch Zellteilung sollte ein geschlossener Zellrasen entstehen, der nur unterbrochen ist an den Stellen an denen sich vermehrungsfähige Viren befinden. An Stellen dieser Lücken haben die Baculoviren nach Durchlaufen ihres Vermehrungszyklus die Zellen lysiert. Die so entstandenen Plaques sind ein Maß für die Anzahl der plaque forming units (pfu/ml). Um die Zellen bzw. die Plaque besser zu differenzieren wurden die Zellen direkt oder nach Fixierung mit 3,7 % Formaldehydlösung über Nacht bei Raumtemperatur gefärbt. Die Färbung erfolgte mit 300 µl je Ansatz einer 0,025 % Neutralrotlösung oder alternativ mit 500 µl einer 0,005 % Kristallviolett-Lösung. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der Plaques in der jeweiligen Verdünnung.

$$\text{Pfu/ml} = \text{Anzahl Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 4$$

#### Ansätze

3 % Agaroselösung	3 % Agaroselösung, pH= 6,2
3 % (w/v) Low melt Agarose 3	3 (w/v) % Low melt Agarose 3
Demineralisiertes Wasser (Milliporeanlage)	25 mM Kaliumphosphatpuffer pH= 6,2

Vor der Verwendung wurden die Agaroselösungen autoklaviert.

DEAE-Dextran	Phosphatbuffered Saline (PBS)
10 mg/ml DEAE Dextran	NaCl 8,00 g
in PBS pH= 7,0 gelöst	KCl 0,20 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,44 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,24 g
	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml
	pH= 7,2

Neutralrotlösung	Kristallviolett-Lösung
0,5 % (w/v) Neutralrot	0,2 % (w/v) Kristallviolett
Demineralisiertes Wasser	10 % Methanol
Vor Gebrauch 1:20 verdünnt	Vor Gebrauch 1:40 verdünnt

### 2.7.3 Expressionsscreening und transiente Expression

Die Infektion von Sf9-Zellen mit Baculoviren und die daran gekoppelte Expression des gewünschten Proteins erfolgen zeitabhängig. So wird die Vermehrung der Viren überwiegend in einer der ersten Phasen vollzogen. Zeitversetzt in einer späteren Phase erfolgt dann die Expression des Proteins (Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Cell Culture Techniques, Invitrogen). Der Zeitraum, in dem die Expression erfolgt, muss für die jeweiligen Bedingungen ermittelt werden. Hierfür werden Insektenzellen einer adhärenenten Kultur oder einer

Suspensionskultur (Kap. 2.5.3.2) mit einer gewählten Virusverdünnung infiziert und in Abständen Proben zur elektrophoretischen Untersuchung entnommen (Kap. 2.6.1). Die geringen Expressionsraten erforderten die Detektion der rekombinanten SNO mit dem Westernblot (Kap. 2.9.8).

Für die Expression der rekombinanten SNO (rSNO) von *Tyria jacobaeae* wurde eine bereits bestehende Virusstocklösung (TMSHT Klon 6, Kap. 2.7.1) von Frau Naumann zur Verfügung gestellt, die nach der Transfektion durch zwei Vermehrungszyklen amplifiziert worden war (Naumann, 2003). Wie schon aus vorherigen Versuchen bekannt führt die Verwendung der Signalsequenz zur Sezernierung des rekombinanten Proteins in das Medium (Naumann, 2003).

Um die Reinigung der rSNO zu vereinfachen, können die Insektenzellen in dem proteinfreien Medium Insect X-Press zur Expression gebracht werden. Für die Expression wird vom Hersteller empfohlen die Insektenzellen an das Insect X-Press zu adaptieren. Deshalb wurde eine Suspensionskultur (Kap. 2.5.3.2) vom routinemäßig verwendeten TC100 + 10 % FBS auf das Expressionsmedium Insect X-Press (BioWhittaker) umgestellt. Hierfür wurde die Suspensionskultur in mehreren Zyklen in Insect X-Press kultiviert bis die Vermehrungsrate die der routinemäßig geführten Suspensionskultur entsprach (Kap. 2.5.3.2).

#### EXPRESSIONSSCREENING

Für die Zeitoptimierung der Expression wurden in die Vertiefungen einer Titerplatte (Zellkultur 24 well Platte, Sarstedt) jeweils  $0,5 \times 10^6$  an Insect X-Press adaptierte Zellen vorgelegt. Diese wurden für eine Stunde bis über Nacht bei  $+ 27^\circ\text{C}$  inkubiert, so dass die Zellen adhären und einen Monolayer bilden konnten. Da die Bestimmung des Virustiters keine brauchbaren Ergebnisse geliefert hatte, mussten die Monolayer nach Austausch des Überstandes durch 500  $\mu\text{l}$  frisches Medium (Insect X-Press) mit einer unbekannten Virusmenge angeimpft werden. Die Expression sollte somit empirisch etabliert werden. Für die Bestimmung eines optimalen Erntezeitpunktes wurden Monolayer mit Volumina von 20 bis 80  $\mu\text{l}$  einer 1:200 Verdünnung der Virusstocklösung angeimpft.

Zellen und Überstände wurden im Zeitraum von 48 – 144 Stunden elektrophoretisch untersucht (Kap. 2.6.1). Von den Medienproben wurden jeweils 20 – 80  $\mu\text{l}$  Aliquots mit der Trichloressigsäure-Fällung (Kap. 2.9.2) konzentriert und auf Expression der SNO geprüft. Äquivalente Volumina der suspendierten Zellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt und ebenfalls elektrophoretisch untersucht. Nach ersten Ergebnissen schloss sich eine Feindifferenzierung an, in der die Zeiträume der Expression von Proben, die ein Signal im Western-Blot (Kap. 2.9.8) ergeben hatten, genauer untersucht wurden.

#### TRANSIENTE EXPRESSION

Für die Expressionen wurden Sf9-Zellen mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Insect X-Press als Suspensionskultur (Kap. 2.5.3.2) mit 120  $\mu\text{l}/\text{ml}$  Ansatz einer 1:200 Verdünnung der Virusstammlösung (Kap. 2.7.3) angeimpft. Die Expression erfolgte in 15 - 30 ml Ansatz je 250 ml Erlenmeyerkolben. Nach 108 h Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und die (vereinten) Medium-Überstände konzentriert (Kap. 2.9.1) und gereinigt.

#### REINIGUNG

Nach Ablauf der Expressionszeit wurden die Zellen vom Medium durch Zentrifugation abgetrennt. Expressionsansätze bis 20 ml wurden mit dem Vivapore - Zentrifugationskonzentrator

(Vivascience, 30 kDa Molekularsieb) konzentriert (Kap. 2.9.1). Für die Reinigung mit der Ni-NTA-Agarose wurden die Konzentrate mit dem Bindungspuffer (Kap. 2.9.11) auf 2,5 ml ergänzt und mit einer PD10-Säule auf Bindungspuffer umgepuffert. Die umgepufferte Probe wurde mit 200 µl der Ni-NTA-Agarose abweichend vom Standardprotokoll für 3 h bei + 4°C inkubiert (Kap. 2.9.11). Zur Entfernung von nicht bindenden Begleitproteinen wurde die Matrix sechsmal mit fünf Volumenteilen<sup>1</sup> Waschpuffer gewaschen. Spezifisch gebundene Proteine konnten nachfolgend achtmal mit einem Volumenteil<sup>1</sup> Elutionspuffer eluiert werden. Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden auf Proteingehalt (Kap. 2.9.3) und qualitativ auf Aktivität getestet (Kap. 2.10.1).

Größere Expressionsansätze ergaben ein deutlich größeres Volumen, welches mit der Amicon-Rührzelle (30 kDa Ausschlußgröße, Kap. 2.9.1) konzentriert und auf Bindungspuffer umgepuffert wurde. Die Reinigung erfolgte mit der Affinitätschromatographie (s. o., Kap. 2.9.11). Die Proben (50 µl) wurden mit der TCA-Fällung (Kap. 2.9.2) konzentriert, elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.6.1) und mit dem Western-Blot detektiert (Kap. 2.9.8). Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden auf Proteingehalt und qualitative Aktivität getestet.

1 bezogen auf das Gelbett-Volumen der vorgelegten Nickel-NTA-Agarose

## 2.7.4 Transfektion von Insektenzellen für die konstitutive Expression

Insektenzellen können nach Übertragung geeigneter Vektoren wie dem pIB/V5-HIS (Invitrogen) (Kap. 2.3, Kap. 2.7.1) konstitutiv Proteine exprimieren (InsectSelect™ BSD System, Invitrogen). Hierfür muss im Gegensatz zu der Übertragung von (rekombinanter) DNA durch (Baculo-) Viren (Kap. 2.7.3, Kap. 3.5.1) DNA durch Übertragungstechniken in eine Wirtszelle eingeschleust werden. Die (nicht virale) Übertragung von DNA durch physikalische Übertragungstechniken wie der Elektroporation oder durch chemische Übertragungstechniken wie die Einschleusung von DNA durch (kationische) Liposomen wird als Transfektion bezeichnet. Für die Transfektion von Sf9-Zellen wurde das kationische Liposomenreagenz Cellfectin® (Invitrogen) verwendet. Die zu übertragende DNA wurde zuerst in Liposomen (Cellfectin®) eingebracht, die nach Fusion mit der tierischen Zellmembran die DNA in das Zellinnere einschleusen.

Für die Transfektion wurden Sf9-Zellen aus einer Suspensionskultur eingesetzt. Diese wurden auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in Insect Xpress eingestellt. Für jeden Transfektionsansatz wurde 1 ml in einer Zellkultur-Testplatte (Wachstumsfläche 9,03 cm<sup>2</sup>) ausgesät und diese 105 min inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 ml Insect X-Press einmalig gewaschen, so dass nicht adhärierende Zellen entfernt wurden. Von jedem Expressionskonstrukt wurden jeweils eine 2 µg und eine 3,9 µg große Plasmidmenge zu einem Ansatz von 20 µl Cellfectinreagenz und 200 µl Insect X-Press gegeben und für 30 min bei + 27°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Ansätze zweimal kurz dispergiert. Die Lösungen wurden dann mit 800 µl Insect Xpress ergänzt und für die Übersichtung der adhären Zellen eingesetzt. Die Transfektion erfolgte für 5 h 30 min bei Raumtemperatur. Nach Abschluss der Transfektion wurden die Überstände durch 2 ml frisches Insect X-Press ersetzt und die Ansätze für 40 – 48 h bei + 27°C inkubiert.

## 2.7.5 Konstitutive Proteinexpression mit Sf9-Zellen

Sf9-Zellen, die mit dem pIB/V5-Vektor (Kap. 2.3, Kap. 2.7.1, InsectSelect™ BSD System, Invitrogen) transfiziert werden, können konstitutiv rekombinantes Protein exprimieren. Hierfür wurden Sf9-Zellen mit Vektor-Zielgenkonstrukten transfiziert (Kap. 2.7.1, Kap. 2.7.4). Die

Selektion erfolgte unter Verwendung des zytotoxischen Antibiotikums Blastacidin, welches auf nicht mit dem pIB/V5-Vektor transformierte Sf9- Zellen (Kap. 2.3) zytotoxisch wirkt. Diese werden bereits in einer Konzentration von 10 µg/ml innerhalb von einer Woche abgetötet.

Für die Selektion von erfolgreich transfizierten Klonen wurden von den Transfektionsansätzen (Kap. 2.7.4) Zellsuspensionen in TC100 hergestellt, die für die Aussaat in einer Mikrotiterschale verwendet wurden. Von jedem Ansatz wurden jeweils Aliquots von 1000 bzw. 10 000 Zellen in einer Mikrotiterschale vorgelegt, die dann 1:2 in einem Reihenverdünnungstest über 8 Verdünnungsstufen pipettiert wurden. Zum Adhärenz der Zellen wurden die Ansätze für 20 h bei + 27°C inkubiert.

Die empfohlenen Konzentrationen von 50 – 80 µg Blastacidin/ml ( InsectSelect™ BSD System, Invitrogen) für ein rasches und effektives Selektieren beziehen sich auf die Verwendung des TNM-FH -Mediums. Optimale Selektionsbedingungen für TC100 mussten deshalb ausgetestet werden. Für die Selektion von resistenten Zelllinien wurden neben unterschiedlichen Konzentrationen unterschiedliche Blastacidin-Konzentrationen getestet. So wurden die Ansätze der Reihenverdünnung einer stringenten Selektion mit 30 bzw. 60 µg Blastacidin/ml für 8 Tage unterworfen. Jede Verdünnungsstufe erhielt alle 96 h 200 µl frisches Medium.

## 2.8 Heterologe Genexpression im *E. coli* System

### 2.8.1 Expression

Für die Expression von rekombinanten SNO's wurden die *E. coli* Stämme BL21 (DE3) und M15 [pREP4] (Kap. 2.5.2.1) eingesetzt. Vektorkonstrukte des pET3a-Vektors (Kap. 2.3, Kap. 2.6.7) wurden in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert (Kap. 2.6.9). Als selektierendes Antibiotikum wurde in allen Kulturen Ampicillin in einer Konzentration von 100 - 200 µg/ml eingesetzt. Vektorkonstrukte des pQE60 (Kap. 2.3, Kap. 3.6.1.2) wurden in den *E. coli*-Stamm M15 [pREP4] transformiert (Kap. 2.6.9). Als selektierendes Antibiotikum wurde in allen Kulturen Kanamycin in einer Konzentration von 50-100 µg/ml eingesetzt.

Von jedem transformierten *E. coli*-Klon wurde eine Vorkultur (7 ml LB-Medium) angeimpft und mit dem erforderlichen Antibiotikum für ca. 12 h inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei + 37°C über Nacht mit 240 Upm im Kulturschrank. Von jeder dieser Vorkulturen wurde am nächsten Tag 1 ml abgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet erneut in 1 ml frischem LB-Medium resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt. Das Zellpellet wurde abschließend in 1 ml LB-Medium resuspendiert und zum Animpfen des 50 ml-Expressionsansatzes verwendet.

Bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 – 1,2 wurde der Expressionsansatz bei + 37°C mit 240 Upm inkubiert. Die Expression wurde mit Isopropylthiogalactosid (IPTG) in einer Konzentration von 0,04 mM induziert. Die weitere Inkubation erfolgte bei + 26°C mit 240 Upm über Nacht (ca. 14 h). Die induzierten Zellen wurden am nächsten Tag sofort aufgearbeitet oder für maximal 30 min bis zur weiteren Aufarbeitung bei + 4°C gelagert.

#### LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### 2.8.2 Expression mit pH-modifizierten LB-Medien

Bei der heterologen Expression von Proteinen können Proteinaggregate entstehen, die nicht die richtige Konformation aufweisen und unlöslich sind. Die Bildung von derartigen Einschlusskörpern (Inclusion bodies, IB) lässt sich bei einigen Proteinen dadurch vermeiden, dass die Expression in einem Medium mit anderem pH-Wert stattfindet. Zu diesem Zweck wurde der pH-Wert des normalerweise verwendeten LB-Mediums nach dem Autoklavieren mit pH= 7,6 ermittelt. Für Expressionen bei unterschiedlichen pH-Werten wurden Aliquots des LB-Mediums nach dem Autoklavieren auf die pH-Werte 7,0, 8,0 und 8,5 eingestellt. Die Ansätze wurden dann mit einem 0,2 µm Vorsatzfilter (Sarstedt) sterilfiltriert und mit dem Expressionsstamm für die mutmaßliche PNO (Kap. 3.6.1.1) angeimpft. Die Expression erfolgte wie in Kap. 2.8.1 beschrieben. Abweichend hiervon wurden die Expressionsansätze mit 0,1 mM IPTG induziert.



### 2.8.3 Expression nach unspezifischer Induktion von Chaperonen

*E. coli*-Expressionsstämme können durch Veränderung der Wachstumsbedingungen in der Expression von Proteinen beeinflusst werden. So lässt sich die heterologe Expressionen dadurch beeinflussen, dass die Zellen bestimmten Wachstums- oder Stressfaktoren ausgesetzt sind. Durch Zugabe von Ethanol sollten unspezifisch *E. coli*-eigene Proteine (Chaperone), die die Faltung des zu exprimierenden Proteins unterstützen können, induziert werden. Die Expression erfolgte wie in Kap. 2.8.1, jedoch mit der Abweichung, dass Ethanol 1 h vor der Induktion zugesetzt wurde (im Ansatz 2 % Ethanol).

### 2.8.4 Aufschlussverfahren

#### AUFSCHLUSS VON *E. coli* MIT ULTRASCHALL

Die induzierten Expressionsansätze wurden im folgenden bei + 4°C bzw. auf Eis weiter aufgearbeitet. Zur Abtrennung des Expressionsmediums wurden die Zellen für 10 – 20 min in einer Beckmann Zentrifuge mit 2600 x g zentrifugiert (3500 Upm in einer Beckmann GS-GR Zentrifuge). Das erhaltene Zellpellet wurde in 5 - 10 ml Waschpuffer (20 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 % Triton X 100, pH= 7,5) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die so gewaschenen Zellen wurden in 6 ml Waschpuffer resuspendiert und in Kunststoff- oder Glasgefäßen mit rundem bzw. konischem Boden überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Ultraschall mit einem Branson Sonifier 250. Hierfür wurden die Zellen 2 x 3 min mit einer Standard Microtipspitze aufgeschlossen (Pulsiereinrichtung 30 – 50 %). Die Abtrennung des Überstandes mit den löslichen Proteinen erfolgte durch Zentrifugation mit der Sorvall-Zentrifuge (DuPont) mit dem SS34 Rotor (10 000 Upm) für 10 min. Das Pellet der nicht löslichen Zellbestandteile, die die heterolog exprimierten Ziel-Proteine als Inclusion bodies enthielten, wurde zweimal mit 6 ml Waschpuffer gewaschen (Zentrifugations. o.).

#### AUFSCHLUSS VON *E. coli* MIT DRUCK (FRENCH PRESS)

Alternativ wurden induzierte *E. coli*-Zellen mit der French® Pressure Cell Press (Polytec) aufgeschlossen. Die Expression erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (2600 x g, 10 min, Sorvall-Zentrifuge) vom Medium abgetrennt und zweimal mit Waschpuffer (20 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 % Triton X100, pH= 7,5) gewaschen (s. o.). Das gewaschene Zellpellet wurde in 12 ml Waschpuffer aufgenommen und zweimal dem Aufschlussverfahren unterzogen (Herstellerprotokoll). Expressionsansätze wurden separat aufgearbeitet und mit 750, 1000 oder 1250 psi aufgeschlossen. Die erhaltenen Zelllysate wurden mit der Sorvall-Zentrifuge in löslichen Überstand und Proteinpellet getrennt. Überstand und Pellet wurden mit einem SDS-Gel untersucht (Kap. 2.9.4). Die Überstände des French Press Aufschlusses wurden mit PD10 Säulen auf Standardpuffer (StP) pH= 7,0 umgepuffert und mit Zentrifugationskonzentratoren (Kap. 2.9.1) 14 – 18-fach konzentriert. Die so erhaltenen umgepufferten, konzentrierten Überstände wurden auf qualitative Aktivität (Kap. 2.10.1) mit radioaktivem Substrat getestet.

## 2.9 Biochemische Methoden

### 2.9.1 Konzentrierung und Umpuffern von Proteinproben

#### KONZENTRIERUNG MIT EINER AMICON-RÜHRZELLE

Proben, die Volumina von ca. 10 – 150 ml aufwiesen, wurden mit einer Amicon-Rührzelle konzentriert. Hierfür wurde eine Ultrafiltrations-Membran mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa verwendet. Die Filtration der Medienüberstände wurde durch Anlegen von 2-4 bar Überdruck durch Stickstoffgas erreicht. Während der Filtration sollte durch Rühren ein Verstopfen der Membran verhindert werden. Die Membran wurde mit 0,5 M NaCl gereinigt und bis zur erneuten Verwendung in 10 % Ethanol + 0,05 % Natriumazid gelagert.

#### KONZENTRIERUNG UND UMPUFFERUNG MIT ZENTRIFUGATIONSKONZENTRATOREN

Das Konzentrieren und Umpuffern von Proteinproben wurde einfach und schnell mit Amicon® Ultra-4 Zentrifugationskonzentratoren der Firma Millipore ausgeführt. Die Konzentratoren verfügen über eine Zellulosemembran, die eine Ausschlußgröße von 30 kDa hat. Monomere der gesuchten Proteine weisen eine relative Molkülmass von ca. 50 kDa auf. Die vom Hersteller garantierte Rückhalterate wurde mehrfach durch Auftragen des Durchlaufs auf ein SDS-Gel kontrolliert. Darüber hinaus trägt auch die geringe Bindungskapazität der Zellulose dazu bei, dass die Verluste während der Konzentrierung marginal sind. Die Konzentratoren sind in besonderer Weise geeignet, weil sie über einen v-förmigen Membranbereich verfügen, bei dem die Membranen während der Zentrifugation auch bei höheren Proteinkonzentrationen nicht verstopfen. Deshalb konnten sowohl Präparationen der Proteinaggregate als auch Ammoniumsulfat-gefällte Hämolympheproben konzentriert bzw. umpuffert werden. Die Proben wurden bis zu einem Volumen von 3,5 ml in die Konzentratoren gefüllt und mit einer Beckmann GS-GR Zentrifuge bei 2000 – 3500 Upm, + 4°C, 5 -15 min zentrifugiert. Zur quantitativen Entfernung von störenden Pufferbestandteilen wie die 200 mM Imidazolkonzentration der Eluate der Affinitätschromatographie (Kap. 2.9.11) konnte mehrfach (2-5 x) Puffer nachgefüllt und konzentriert werden.

#### UMPUFFERUNG VON PROTEINPROBEN MIT PD10 SÄULEN

Alternativ konnten Proben mit PD10-Fertigsäulen umpuffert werden. Diese wurden vor Beginn mit drei bis vier Säulenvolumina des gewünschten Puffers äquilibriert. 2,5 ml Probelösung wurden auf jeweils eine Säule gegeben und der Durchlauf verworfen. Mit 3,5 ml Puffer wurden die Proben eluiert. Bei kleineren Probevolumina wurden diese auf die Säule gegeben. Nach dem Einziehen wurde Puffer bis zum Sollvolumen von 2,5 ml ergänzt auf die Säule gegeben und der Durchlauf verworfen. Die Probe wurde dann in Abhängigkeit vom Probevolumen mit einem kleineren Volumen (2 x Probevolumen, mindestens aber 1 ml) eluiert. Die PD10 Säulen ließen sich für den weiteren Gebrauch durch Spülen mit einem Säulenvolumen 0,2 M NaOH und 4 – 5 Säulenvolumina 0,5 M NaCl-Lösung regenerieren. Bis zur erneuten Verwendung wurden die Säulen in 0,5 M NaCl-Lösung + 0,05 M Natriumazid (bakterizid) bei + 4°C gelagert.

## 2.9.2 Proteinfällungen

### AMMONIUMSULFATFÄLLUNG

Frisch entnommene Hämolymphe, die nicht sofort aufgearbeitet wurde, konnte mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung gefällt werden. Das gefällte Protein wurde dann durch Zentrifugation mit der Sorvall Zentrifuge RC 5B (SS34 Rotor) für 10 min mit 20 000 g bei + 4°C abgetrennt. Die so erhaltene Proteinfällung konnte für ca. 1 Jahr bei – 20°C oder bei – 80°C gelagert werden.

Für das Fällungsreagenz wurden 77 g Ammoniumsulfat mit 100 ml gekühltem Standardpuffer (10 mM Kaliumphosphatpuffer pH= 7 mit 2 mM DTT) versetzt. Die Fällungen erfolgten mit stets gekühlter Ammoniumsulfatlösung und in einem Verhältnis von 5 ml zu 1 -1,25 ml Probe für mindestens 60 min gekühlt (Eis) unter gelegentlichem, vorsichtigem Schwenken.

### FÄLLUNG MIT TRICHOLORESSIGSÄURE

Gering-konzentrierte Proteinproben wie die Proben aus dem Expressionsscreening der Insektenzellexpression konnten vor der Auftrennung mit SDS-PAGE mit Trichloressigsäure gefällt und somit konzentriert werden. Hierfür wurde eine vorgelegte Probelösung mit 1/10 VT 0,1 % Deoxycholatlösung (DOC) in 0,02 % (w/v) Natriumazid und 1/10 VT einer 55 % Trichloressigsäure versetzt. Die Fällung erfolgte für mindestens 1 h bis über Nacht bei + 4 °C. Die Proteinprobe wurde dann 20 min bei 13 000 Upm (Hereaus-Tischzentrifuge) bei + 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Um die verbleibende Trichloressigsäure der Fällung abzupuffern, wurden die Proben in 5 – 10 µl des SDS-Trenngelpuffer pH= 8,8 aufgenommen und mit SDS-PAGE untersucht (Kap. 2.9.4).

## 2.9.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Für die quantitative Gehaltsbestimmung von Proteinproben wurde die Methode nach Bradford (1976) verwendet. Die Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine (überwiegend an Arginylreste) im sauren Milieu. Durch die Bindung ergibt sich eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoff-Chromophors von 465 zu 595 nm, so dass sich die Farbe von rot nach blau ändert. Die resultierende Absorptionsänderung ist proportional der Proteinkonzentration und photometrisch bei 595 nm messbar. Für die quantitativen Gehaltsbestimmungen wurde eine Eichgerade in dem Konzentrationsbereich 0,01 bis 0,05 mg BSA/ ml mit dem Proteinstandard Rinderserumalbumin (BSA, Serva) erstellt. Hierfür wurden 20 µl der Proben jeweils mit 1 ml Bradfordreagenz versetzt und gemischt. Nach Entwicklungszeit von mindestens 2 min bis maximal 30 min wurden die Proben mit dem Photometer (Ultraspec 3100 pro, Fa. Amersham Pharmacia) bei 595 nm vermessen. Der Nullabgleich wurde in analoger Weise mit Wasser bzw. Puffer ausgeführt. Für die Messungen wurden Küvetten mit 1 cm Schichtdicke benutzt. Proteinproben mit einem höheren Gehalt als der durch den Bereich der Eichgeraden abgedeckte wurden mit Puffer auf eine entsprechende Konzentration verdünnt und dann dem Bradfordreagenz zugefügt.

**Bradfordreagenz**

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 wurden in 50 ml 96 % (v/v) Ethanol gelöst. Hierzu wurden 100 ml 85 % (w/v) Phosphorsäure gegeben und die Lösung mit demineralisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Vor der Verwendung wurde die Lösung filtriert.

**2.9.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteingemische konnten mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt werden. Anschließend konnten die Proteine mit unterschiedlichen Detektionsverfahren wie z. B. der Coomassiefärbung (Kap. 2.9.5) detektiert werden. Diese Elektrophorese wurde zur Untersuchung von Proteingemischen eingesetzt, um den Erfolg von Expressionen und Proteinreinigungen nachzuweisen.

Für die Elektrophorese wurden Mini-Protean 2 oder 3 Kammern (Biorad) verwendet, die eine vertikale Trennung ermöglichen. Als Spannungsquelle wurde der Multidrive XL (Pharmacia) verwendet. Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese beruht auf der Verwendung eines unterschiedlich zusammengesetzten Geles. Hierfür wurde zuerst das Trenngel in einer vertikalen Apparatur gegossen. Nach dem Polymerisieren wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Noch im flüssigen Zustand wurde ein Kamm in das Gel gesteckt, der so nach dem Polymerisieren Probentaschen im Sammelgel hinterließ. Bei Verwendung eines 10er Kammes ergaben sich Probentaschen für je maximal 20 µl Probenvolumen.

**ANSATZ<sup>1</sup>**

Bestandteil	Trenngel (12 %)	Sammelgel (4 %)
H <sub>2</sub> O	3,35 ml	6,10 ml
0,5 M Tris, pH= 6,8	----	2,50 ml
1,5 M Tris, pH= 8,8	2,70 ml	---
SDS 10 % (w/v)	0,10 ml	0,10 ml
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamidlösung)	4,00 ml	1,30 ml
Ammoniumpersulfat- lösung (10 % w/v)	70,0 µl	70,0 µl
TEMED (S. 1)	35,0 µl	35,0 µl

<sup>1</sup> Die Ansätze für Sammel- und Trenngel reichen für jeweils für 2 Gele

<sup>2</sup> Über die Menge von Ammoniumpersulfat und TEMED läßt sich die Polymersisationsgeschwindigkeit beeinflussen

Die Proben wurden mit 2 x Probenpuffer im Verhältnis 1:2 versetzt und in einem Thermoblock für mindestens 5 min bei + 95°C aufgeköcht. Diese Proben wurden dann in die Probentaschen des Sammelgels pipettiert. Eine 10 kDa Proteinleiter (Invitrogen) wurde als Standard für den Vergleich des Molekulargewichtes aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Elektrodenpuffer mit einer konstanten Spannung von 200 V. Zu Beginn betrug die Stromstärke 75 mA, die im weiteren kontinuierlich abnahm. Die Elektrophorese wurde beendet sobald die Farbstofffront des Elektrodenpuffers die untere Glasplatte erreichte. Die Darstellung der Proteintrennung im Gel

konnte direkt im Anschluss mit der Coomassiefärbung (Kap. 2.8.4) gemacht werden. Diese erlaubte einen Nachweis bis zu 0,1 - 0,3 µg je Proteinbande.

#### LÖSUNGEN

##### 2 x Probenpuffer

Tris 0,5 M	1,0 ml
Glycerin	2,0 ml
SDS 10 %	3,3 ml
β- Mercaptoethanol	0,5 ml
Bromphenolblau 0,5 % (w/v)	0,5 ml
H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	2,7 ml
pH 6,8	

##### 10 x SDS-Elektrodenpuffer

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	ad 1000 ml
pH ca. 8,3 ! Kein Einstellen des pH-Wertes!	
1 x SDS-Elektrodenpuffer durch 1:10 Verdünnung mit H <sub>2</sub> O	

Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamidlösung, Roth):

30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (Verhältnis 37,5:1)

<sup>a</sup> Wasserqualitäts siehe Kap. 2.1

## 2.9.5 Färbung von SDS-Elektrophoresegelelen

Mit der Coomassie-Blau-Färbung wurden SDS-Gele nach Auftrennung der Proteinproben gefärbt. Die SDS-Gele wurden direkt in der Färbelösung innerhalb einer Stunde unter leichtem Schütteln angefärbt. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte in zwei Stufen. Mit Entfärber 1 wurde das Gel für 30 min inkubiert. Infolge von Entfärber 1 schrumpfte das Gel durch Wasserentzug. Dieses war aber vollständig reversibel und erfolgte während der Behandlung mit Entfärber 2. Die Gele wurden bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in Entfärber 2 inkubiert. Für eine langfristige Lagerung konnten die Gele in Plastikfolie eingeschweißt und bei + 4°C in Entfärber 2 gelagert werden.

#### LÖSUNGEN

##### Färbelösung

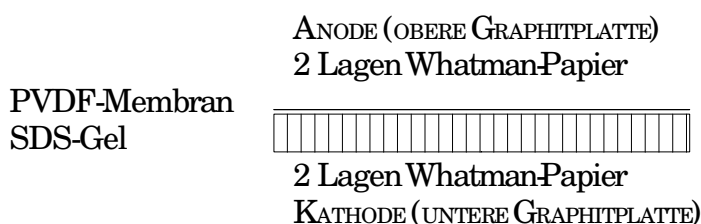
Coomassie Blau R-250, 1 % (w/v)	25 ml
Methanol	100 ml
Eisessig	20 ml
H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	ad 200 ml

	Entfärber 1	Entfärber 2
Methanol	100 ml	10 ml
Eisessig	20 ml	14 ml
H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	ad 200 ml	ad 200 ml

<sup>a</sup> Wasserqualitäts siehe Kap. 2.1

### 2.9.6 Blotten von SDS-Elektrophoresegelen

Nach der Auftrennung von Proteingemischen durch SDS-PAGE (Kap. 2.9.4) konnten andere Detektionsverfahren als die Coomassiefärbung eingesetzt werden. Hierfür mussten die Proteine auf eine Membran übertragen (geblottet) werden. Das Blotten erfolgte elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Membran, welche dann als Träger entweder die Detektion mit Antikörpern (Westernblot) und/oder die Indian Ink Färbung ermöglichte. Vor dem Blotten wurden Membranstücke in Größe des Trenngels vorbereitet. Die Membranen wurden zuerst kurz mit Methanol und dann mit zwei gleich großen Stücken Whatman-Papier im Blotpuffer bis zur Verwendung benetzt. Die verwendete Blotapparatur Multiphor 2 Nova Blot electrophoretic transfer unit (Pharmacia) wurde wie folgt beladen:



Die einzelnen Schichten des Blotaufbaus müssen luftblasenfrei aufeinander liegen. Das Blotten erfolgte mit der Spannungsquelle Multidrive XL (Pharmacia) mit der für ein Gel eine Stromstärke von 120 mA für 55 – 65 min angelegt wurde. Beim Blotten von zwei Gelen wurde eine Stromstärke von 160 mA angelegt.

10 x BLOTPUFFER		1 x BLOTPUFFER	
Tris (Base)	58,0 g	10 x Blotpuffer	100 ml
Glycin	29,0 g	Methanol	200 ml
SDS	3,7 g	H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	ad 1000 ml
H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	ad 1000 ml		

### 2.9.7 Indian Ink Färbung von Blotmembranen

Nachdem die aufgetrennten Proteinproben auf Membranen geblottet waren, stand neben der Coomassiefärbung (Kap. 2.9.5) die Färbung mit Indian Ink zur Verfügung. Die Indian Ink Färbung ist eine unspezifische Färbemethode für Proteine, die jedoch deutlich sensitiver als die Coomassiefärbung ist. Mit der Coomassiefärbung können 0,3 µg Protein je Bande und mit der Indian Ink Färbung noch 30 ng je Bande gefärbt werden. Bei der Indian Ink Färbung lagern sich kolloidale Kohlepartikel der Tinte unspezifisch an Proteine, die dann auf der Blotmembran als schwarze Banden erkennbar sind. Zur Größenbestimmung von Proteinbanden wurden Proteinleitern eingesetzt. Die Methode ist darüber hinaus einfach und schnell durchführbar. Auch schon bereits zuvor mit dem Westernblot entwickelte Membranen konnten nach kurzem Spülen mit Wasser oder PBS-Tween-Puffer gefärbt werden. Die Blotmembranen wurden zuerst ca. 5 min mit Wasser (Kap. 2.1) oder PBS-Tween in einer Plastikschaale gewaschen. Die Färbung erfolgte dann für 1 h bis über Nacht unter gleichmäßigem Schütteln. Abschließend wurde die Membran mit Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

## PHOSPHAT- BUFFERED SALINE (PBS)

## PBS-TWEEN

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	ad 1000 ml

PBS mit 0,1 % (v/v) Tween® 20

## INDIAN INK TUSCHELÖSUNG

PBS-Tween	100 ml
Eisessig	1 ml
Fount India Tinte (Pelikan)	100 µl

Vor Gebrauch wurde die Färbelösung filtriert.

<sup>a</sup> Wasserqualitätssiehe Kap. 2.1**2.9.8 Westernblot**

Für ein alternatives Detektionsverfahren (vgl. Indian Ink Färbung, Kap. 2.9.7) für die SNO von *T. jacobaeae* (Kap. 3.5.1) stand ein polyklonaler Antikörper zur Verfügung. Dieser erkennt sowohl die native als auch die rekombinante SNO von *T. jacobaeae* (Naumann, 2003). Für die Detektion mit dem Western-Blot wurden Proteinproben mit SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. 2.9.4) und auf eine PVDF-Membrane geblottet (Kap. 2.9.6).

Zum Entfernen des Blotpuffers wurden die Membranen kurz mit dem TBS-Tween Puffer gewaschen. Die noch verfügbare Bindungskapazität der Membran für Proteine, an den Stellen wo keine Proteine der Probe geblottet bzw. gebunden wurden, musste im ersten Schritt abgesättigt werden, um die unspezifische Anlagerung des Primär-Antikörpers an die Membran zu unterbinden. Hierfür wurde eine Lösung von 10 % (v/v) Halfettmilch in TBS-Tween Puffer verwendet. Die Sättigung der Membran durch Milchproteine wurde mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. In dieser Lösung konnte die Membran bei Bedarf über Nacht bei + 4°C gelagert werden.

Die Markierung mit dem Primär-Antikörper (s. o.) erfolgte in einer Verdünnung von 1:40 000 (entspricht einer Konzentration von 22 ng/ml, Naumann 2003) in TBS-Tween + 10 % (v/v) Halfettmilch für eine Stunde und konnte ebenfalls bei +4°C über Nacht gelagert werden. Überschüssiger Antikörper wurde zweimal je 5 min mit TBS-Tween, TBS-Tween + 0,5 M NaCl, TBS-Tween + 0,5 % Triton X100 und einmal mit TBS-Tween für 5 min gewaschen. Ein verfügbarer Sekundär-Antikörper (Goat-Anti-Rabbit, Dianova), der mit einer Meerettich-Peroxidase gekoppelt war, wurde in der Verdünnung von 1:2500 in TBS-Tween ohne Milch für eine Stunde inkubiert. Der Sekundär-Antikörper verfügt über eine Bindungsaffinität gegen den Primär-Antikörper, der durch Immunisierung eines Kaninchens gewonnen wurde. Nicht gebundener Sekundär-Antikörper wurde analog dem Ersten abgewaschen (s. o.).

Die Detektion erfolgte mit dem ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham Biosciences) durch Chemolumineszenz. Hierfür wurde nach Herstellerprotokoll das Detektionsreagenz, welches Luminol enthält, gemischt, gleichmäßig auf dem Blot verteilt und für 1 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Blot zwischen zwei Projektor-Folien luftblasenfrei gelegt. Die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Spaltung von Luminol durch

Wasserstoffperoxid. Durch diese Reaktion wird das Luminol in einen angeregten Zustand überführt, von dem das Luminol unter Emission von Lichtenergie in den Grundzustand zurückfällt. Durch Auflegen eines Röntgen-Films (auf die Projektor-Folie) für 30 – 60 sec wurde die emittierte Energie auf den Röntgen-Film übertragen. Dieser wurde anschließend entwickelt.

Tris-buffered Saline (TBS)		TBS-Tween
NaCl	8,00 g	TBS mit 0,1 % Tween 20
KCl	0,20 g	
Tris (Base)	3,00 g	TBS-Tween 10 % Halbfettmilch
H <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml	Halbfettmilch wurde aliquotiert eingefroren
Mit HCl auf pH 8,0 eingestellt		und bei Bedarf aufgetaut

### 2.9.9 Solubilisierung der Inclusion Bodies (IB)

Die heterologe Genexpression von Proteinen aus Eukaryonten kann in *E. coli* zur Bildung von nicht richtig gefalteten Proteinen führen (vgl. Naumann et. al., 2002). Proteine, die eine nicht richtige Konformation während einer heterologen Genexpression erhalten, neigen zur Aggregatbildung und zeigen deutlich vom nativen Protein abweichende physikochemische Eigenschaften. So haben diese Proteine häufig eine nur sehr schlechte Löslichkeit, welche in den verschiedensten Aufarbeitungen zum Ausfallen der Proteine führen kann. Derartige Proteinaggregationen werden als Einschlusskörper (Inclusion bodies, IB) bezeichnet.

Proteine, die als Einschlusskörper vorliegen, sind in aller Regel nicht aktiv, können jedoch durch Faltung in eine aktive Konformation überführt werden. Die Gefahr der Bildung von Einschlusskörpern (IB) in *E. coli* besteht besonders für Proteine, die im nativen Zustand mehrere Disulfidbrücken aufweisen. Im reduktiven, cytoplasmatischen Milieu von *E. coli* können Disulfidbrücken nur unvollständig und/ oder falsch ausgebildet werden. Auch die nativen posttranslationalen Modifikationen, wie sie bei Eukaryonten häufig vorkommen, können durch *E. coli* oft nicht ausgeführt werden. Da die exprimierten Zielproteine fast ausschließlich als nicht lösliche Proteinaggregate bzw. Inclusion Bodies (IB) vorlagen (Kap. , Kap. 3.6.1.2), mussten diese für die sich anschließende Faltung (Kap. 2.9.10) wieder in Lösung gebracht werden (Solubilisierung).

Die Expression der rekombinanten Zielproteine erfolgte wie in Kap. 2.8.1 beschrieben. Nach Aufschluss der induzierten *E. coli* Klone (Kap. 2.8.4) im Waschpuffer (20 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X100, pH= 7,5) wurden die erhaltenen Suspensionen mit der Sorvall-Zentrifuge (10 000 Upm, 10 min, + 4°C) in Überstand und Pellet geschieden. Im Pellet waren fast ausnahmslos die denaturierten Zielproteine (IB) vorzufinden, die von schwankenden Anteilen Begleitproteinen und anderen, unlöslichen Zellbestandteilen verunreinigt wurden. Das Pellet wurde dann mit 6 ml Waschpuffer resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde zum Waschen des Pellets wiederholt.

Für die Solubilisierung wurde zuerst das Feuchtgewicht der isolierten Inclusion Bodies ermittelt und diese dann mit dem jeweiligen Solubilisierungspuffer auf 10 mg/ml Feuchtgewicht eingestellt. Die Solubilisierung erfolgte mit einem 0,1 M Glycinpuffer pH= 11,0, 1 mM DTT, der das Detergenz *N* – Lauroylsarcosin 3 % (w/v) enthielt (Naumann, 2003). Die resuspendierten IB



wurden dann auf Eis für 35 min bis 120 min bei + 4°C unter gelegentlichem vorsichtigem Invertieren inkubiert. Eventuell auftretende Niederschläge (Trübung) wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der verbleibende Überstand in einen Dialyseschlauch überführt.

<sup>a</sup> Die vollständigen Volumina der Proben entsprechen einem Volumenteil (VT). Die Puffer wurden mit einem Vielfachen (10 bzw. 11 x) dieser Probelösung eingesetzt.

## 2.9.10 Renaturierung von solubilisierten Proteinen

Die nach Expression (Kap. 2.8.1) bzw. dem Aufschluss (Kap. 2.8.4) erhaltenen Inclusion bodies wurden zur Wiederherstellung einer aktiven Konformation zuerst solubilisiert (Kap. 2.9.9) und nachfolgend durch Dialyse mit dem Faltungspuffer (s.u.) gefaltet. Die Dialyse der Solubilisierungslösungen (Kap. 2.8.10) wurde in Dialyse-Schläuchen bei + 4°C durchgeführt, die vor erstem Gebrauch in Wasser (Kap. 2.1) aufgekocht wurden. Nach Gebrauch wurden die Dialyseschläuche mit Wasser gereinigt und konnten so in Wasser unter Zusatz von 0,05 % Natriumazid bis zur erneuten Verwendung bei + 4°C gelagert werden.

<b>I</b>	<b>1</b>	---	<b>2</b>
Zeit [h]	20 – 24		120 + 454
Zusätze			0,05 mM FAD 1 mM red. Glutathion 0,2 mM ox. Glutathion
<b>II</b>	<b>1</b>	---	<b>2</b>
Zeit [h]	20 – 24		120
Zusätze	1 mM DTT		0,05 mM FAD 1 mM red. Glutathion 0,2 mM ox. Glutathion 1 mM DTT
<b>III</b>	<b>1</b>	<b>1a</b>	<b>2</b>
Zeit [h]	65	2	137 + 250
Zusätze	1 mM DTT	---	0,2 mM FAD 1 mM red. Glutathion 0,2 mM ox. Glutathion 1 mM DTT
<b>IV</b>	<b>1</b>	<b>1a</b>	<b>2</b>
Zeit [h]	65	30	137
Zusätze	1 mM DTT	---	0,2 mM FAD 1 mM red. Glutathion 0,2 mM ox. Glutathion 1 mM DTT

Abbildung 2: Faltungsprotokolle I – IV  
 Alle Dialyseansätze wurden in einem 20 mM Tris-Puffer pH= 8,5 mit den oben genannten Zusätzen durchgeführt. Die Dialysestufen der einzelnen Protokolle sind mit 1 – 2 bezeichnet.  
 1 Umpuffern von der Solubilisierungslösung auf Faltungspuffer  
 1a DTT-freier Zwischenschritt  
 2 vollständiger Faltungspuffer

Für die Wiederherstellung einer aktiven Konformation von solubilisierten Inclusion bodies sind bestimmte, empirisch zu ermittelnde Faltungsbedingungen erforderlich, die durch verschiedene Puffer und faltungsunterstützende Substanzen beeinflussbar sind. Durch die vorherigen Ergebnisse

der Faltung der rekombinanten Tyria-SNO (Naumann, 2003) wurde ein 20 mM Tris-Puffer (pH= 8,5) eingesetzt, der mit Zusätzen, die die Faltung unterstützen sollten, als Faltungspuffer (s. u.) eingesetzt wurde. Die Faltungsbedingungen wurden wie in Abbildung 2, S. 45 beschrieben variiert.

#### NICHT-SUKZESSIVE DIALYSE

Für die Wiederherstellung einer aktiven Konformation von solubilisierten Inclusion bodies besteht im Vergleich zum sukzessiven Umpuffern (s. Abbildung 2: Faltungsprotokolle I – IV) von Probelösungen auf Faltungsbedingungen die Möglichkeit durch direktes Einbringen der Solubilisierungslösung in den Faltungspuffer aktive Proteine zu erhalten (Lange et. al. 2004). Hierfür wurden in einem Dialyseschlauch 30 ml Faltungspuffer<sup>1</sup> vorgelegt, der dann in 80 ml Faltungspuffer eingehängt wurde. Nacheinander wurden fünf Volumina von je 300 µl einer auf 10 mg/ml eingestellte Solubilisierungslösung (Kap. 2.9.9, Kap.3.6.2) jeweils nach 30 min direkt zu dieser Dialyselösung pipettiert. Eine Stunde nach der letzten Zugabe und dann ca. alle 96 h wurde der Faltungspuffer (300 ml) gewechselt. Die Dialyse erfolgte für 250 – 260 h bei + 4°C.

<sup>1</sup> Faltungspuffer: 1 mM reduziertes Glutathion, 0,2 mM oxidiertes Glutathion und 0,1 mM FAD, pH= 8,5, Puffer wurde auf ca. + 4°C vorgekühlt eingesetzt.

### 2.9.11 Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine

Proteine, die über eine Proteinsequenz aus sechs Histidinresten (HIS-Tag) verfügen, können durch eine Affinitätschromatographie mit immobilisierten Nickel-Ionen gereinigt werden. Für die Reinigung der exprimierten Proteine mit HIS-Tag wurde eine Ni-NTA-Agarose (Qiagen) eingesetzt. Diese verfügt über den an Sepharose CL-6B gebundenen Liganden Nitrilo-Tri-Essigsäure (NTA), welcher mit vier Koordinativ-Bindungsstellen je Molekül ein Nickel-Ion bindet. Das HIS-Tag-Motiv bildet unter bestimmten Pufferbedingungen mit den zwei noch möglichen Koordinativ-Bindungsstellen der Nickel-Ionen Chelatkomplexe aus Begleitproteine, die keinen HIS-Tag haben, lassen sich von der Matrix durch Puffer entfernen. Durch gezielte Variation der Pufferbedingungen können sowohl Begleitproteine, die durch unspezifische Wechselwirkungen mit der Matrix interagieren, entfernt als auch die spezifischen Chelatkomplexe gelöst werden (Herstellerprotokoll, Qiagen). Als spezifizierender Zusatz für die Reinigung wurde Imidazol verwendet, welches wie die sechsfache Histidinsequenz Wechselwirkungen mit den Nickel-Ionen ausbilden kann. Durch kompetitive Verdrängung kann Imidazol in Abhängigkeit von der Konzentration die sechsfache Histidinsequenz aus den Chelatkomplexen lösen und somit die Proteine verdrängen, die dann eluiert werden.

Für die Reinigung bestimmte Proben (Kap.2.7.3, Kap. 2.9.10) wurden auf den Bindungspuffer umgepuffert (Kap. 2.9.1) und die Ni-NTA-Agarose mit Bindungspuffer äquilibriert. Die Probelösung wurde bei + 4°C für mind. 90 min bis über Nacht mit der Ni-NTA-Agarose (Herstellerprotokoll, Qiagen) in einer PD10-Säule mit Fritte inkubiert. Während der Inkubation wurde mit 3 Upm durch eine kontinuierliche, vertikale Drehbewegung gemischt. Nach der Kopplung wurde die Matrix durch Filtration vom Bindungspuffer abgetrennt und mit 3 – 8 mal mit je 5 VT<sup>a</sup> Waschpuffer gewaschen. Die Elution der exprimierten Proteine von der Matrix erfolgte mit 8- 10 Elutionsfraktionen mit jeweils 1 VT<sup>a</sup> Elutionspuffer. Proteinhaltige Elutionsfraktionen wurden vereint und konzentriert (Kap. 2.9.1) oder direkt auf Aktivität geprüft (Kap. 2.10.1, Kap. 2.10.3, Kap. 2.10.2).

Nach Gebrauch wurden die Ni-NTA-Matrix nach Herstellerprotokoll regeneriert und in 30 % Ethanol bei + 4°C gelagert.

<sup>a</sup> Eingesetzte Matrixmenge der Ni-NTA-Agarose wurde als 1 Volumenteil (VT) angenommen

Bindungspuffer	[mM]	Waschpuffer	[mM]	Elutionspuffer	[mM]
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50
NaCl	300	NaCl	300	NaCl	300
Imidazol	20	Imidazol	50	Imidazol	250
2-Mercaptoethanol	1	2-Mercaptoethanol	1	2-Mercaptoethanol	1
pH= 8,0		pH=8,0		pH=8,0	

## 2.10 Aktivitätsbestimmungen

### 2.10.1 Qualitative Aktivitätsbestimmung mit radioaktiv markiertem Senecionin

Zum qualitativen Nachweis einer *N*-Oxygenierung von tertiären Pyrrolizidinalkaloiden wurde ein Analysenverfahren nach Lindigkeit, 1996 bzw. Naumann, 2003 verwendet, welches ausschließlich <sup>14</sup>C-radioaktiv markiertes Senecionin als Substrat verwendet. Das Analysenverfahren weist eine hohe Empfindlichkeit auf, so dass selbst geringste Aktivitäten noch nachgewiesen werden können. Das radioaktive Senecionin wurde mit Proben und dem erforderlichen Cosubstrat Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat NADPH (Lindigkeit, 1996) in einem 10 mM Kaliumphosphatpuffer bei + 37°C inkubiert. In Reaktionsansätzen, die eine Aktivität aufwiesen, wurde das tertiäre Pyrrolizidinalkaloid in das korrespondierende *N*-Oxid umgesetzt (Kap. 1.3, S. 5.) Die Trennung des tertiären Senecionins vom korrespondierenden *N*-Oxid erfolgte nach Aufarbeitung der Proben mit der Dünnschichtchromatographie (DC). Die qualitative und quantitative Detektion wurde mit dem Radio-DC-Scanner System RITA (Rapid Intelligence TLC Analyser) durchgeführt.

Das <sup>14</sup>C-markierte Senecionin wurde in Methanol gelöst und mit 15 000 Zählimpulse in einer Minute (cpm) je Probe in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf, 1,5 ml) vorgelegt. Die Ansätze wurden nach Verdunsten des Methanol bei Raumtemperatur direkt in die Reaktionsgefäße pipettiert. Als Cosubstrat wurde NADPH (AppliChem) in einem 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH= 7,0, + 2 mM DTT (Lindigkeit, 1996) gelöst eingesetzt.

Reaktionsansatz für Qualitative Aktivitätsbestimmung	
<sup>14</sup> C markiertes Senecionin in Methanol	15 000 cpm
Eintrocknen der Substratlösung	
	[μl]
Probelösung in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mM DTT, pH = 7,0	10 – 40
2 mM NADPH	10,0
10 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mM DTT, pH = 7,0	ad 50,0

Die Reaktionsansätze wurden für 30 – 120 min bei +37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Reaktionen mit 17 µl einer 2 N HCl gestoppt. Zur Entfernung des Lösungsmittels wurden die Proben unter Luftstrom getrocknet. Für die Auswertung mit der Radio-DC wurden die Proben in 10 µl Methanol aufgenommen und auf eine DC-Kieselgel-Platte F<sub>245</sub> (0,25 mm Schichtdicke, Merck) aufgetragen (Kap. 2.1.8). Die DC-Platte wurde mit einem PA-N-Oxid-Fließmittel nach Naumann (2003) mit Kammersättigung über eine Laufstrecke von ca. 18 cm bei Raumtemperatur entwickelt. Die Detektion der radioaktiven Substanzen mit dem Radio-DC-Scanner erfolgte mit einem Argon-Methan-Gemisch (90:10) als Zählgas.

PA-N-Oxid-Fließmittel	Volumenteile
Dichlormethan	85
Methanol <sup>A</sup>	15
Ammoniaklösung 25 %	3

<sup>A</sup> Bei Auftreten einer Trübung durch unvollständig gelöstes Ammoniak wurde vorsichtig Methanol zugegeben, bis die Trübung des Fließmittels verschwand

### 2.10.2 Optischer Aktivitätstest

Für die quantitative Aktivitätsbestimmung stand bereits ein photometrisches Analysenverfahren zur Verfügung (Lindigkeit, 1996, Naumann, 2003). Die bekannten Senecionin *N*-Oxygenasen benötigen für ihre Aktivität neben einem Pyrrolizidinalkaloid als Substrat und molekularen Sauerstoff das Cosubstrat Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat NADPH (Abbildung 1, S. 5). Das Cosubstrat weist in seiner reduzierten Form ein breites Absorptionsmaximum bei 340 nm auf, während die oxidierte Form in diesem Wellenlängenbereich praktisch keine Absorption aufweist. Die mit der enzymatischen Aktivität der Senecionin *N*-Oxygenasen gekoppelte Oxidation von NADPH führt zu einer Abnahme der Konzentration des NADPH, welche durch photometrische Absorptionsmessungen bei 334 nm oder 340 nm bestimmbar ist. Die direkte Proportionalität zwischen Absorption und der Konzentration des NADPH ermöglicht die quantitative Bestimmung der Enzymaktivität.

Reaktionsansatz	Volumen Konzentration im Ansatz	
	[µl]	[µM]
1. Probe in 10 mM Kaliumphosphatpuffer	50-300	
2. 2 mM NADPH in 10 mM Kaliumphosphatpuffer	50,0	250
3. 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH= 7,0)	ad 360,0	
4. 2 mM Senecionin	40,0	200
Gesamtvolumen	400,0	

Die Messungen erfolgten mit (Halbmikro-) Küvetten (Schichtdicke 1 cm) und einem Volumen von 400 µl mit dem Spektrallinienphotometer Ultrospec 3100 pro (Amersham Pharmacia). Die Messungen der Reaktionsansätze wurden in einem thermostatisierten Küvettenhalter bei + 37°C durchgeführt. Zur Auswertung und Speicherung konnten die Messwerte durch eine dazu gehörige Software (Biochrom) auf einen PC übertragen werden. Für die Messung der Aktivitäten wurde die NADPH- und Senecioninlösung in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mM DTT, pH= 7,0

(Lindigkeit, 1996) angesetzt. Proben wurden auf diesen 10 mM Kaliumphosphatpuffer umgepuffert (Kap. 2.9.1).

Die Lösungen 1 – 3 wurden in der Küvette gemischt und zur Temperierung für 3 min bei + 37°C vorinkubiert. Um einen möglichen unspezifischen NADPH-Verbrauch durch Nebenreaktionen zu bestimmen, wurde 2 min vor der Zugabe des Substrates die Veränderung der Absorption gemessen. Durch Zugabe der auf + 37°C vorgewärmten Senecioninlösung wurde die Reaktion gestartet. Darüber hinaus wurden jeweils Kontrollwerte vermessen, bei denen das Substratvolumen (Lösung 4) durch den 10 mM Kaliumphosphatpuffer ersetzt wurde.

Die Berechnung der Aktivitäten erfolgte nach folgender Formel:

$$U/\text{ml} = \Delta A \times \text{min}^{-1} \times V \times \epsilon^{-1} \times V_E^{-1} \times d^{-1}$$

U/ ml	Enzymeinheiten/ ml ( $\mu\text{mol}/\text{ml} \times \text{min}$ ), 1 U = 16,67 nkat
$\Delta A/\text{min}$	Absorptionsänderung/min
V	Volumen in der Küvette (ml)
$V_E$	Volumen der eingesetzten Enzymlösung (ml)
d	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
$\epsilon$	$\mu\text{molarer Absorptionskoeffizient} (\mu\text{mol}^{-1} \times \text{cm}^2)$
$\epsilon_{340\text{ nm}}$	6,30 (Bergmeyer, 1975; Ziegenhorn, et. al. 1976)

Der Optische Test diente als Vergleich für den zu etablierenden Aktivitätstest mit Unterfütterung von radioaktiven Substrat (Kap. 2.10.3).

### 2.10.3 Radioaktiver Unterfütterungstest

Der für die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität der Senecionin-*N*-Oxygenase bereits zur Verfügung stehende Optische Aktivitätstest (Lindigkeit, 1996, Naumann, 2003, Kap. 2.10.2), erwies sich für die heterolog exprimierten PNOs als ungeeignet, da die nach Renaturierung der Inclusion bodies (Kap. 2.9.10, Kap. 3.6.2) erhaltenen Proben über eine nicht ausreichende spezifische Aktivität verfügten (Lindigkeit, 1997, Kap. 3.6.2). Deshalb musste ein Analysenverfahren mit höherer Empfindlichkeit als die des bestehenden Optischen Aktivitätstest entwickelt werden, welches eine Quantifizierung von Enzymaktivitäten bei nur geringer spezifischer bzw. absoluter Aktivität ermöglichte.

Da der bestehende Qualitative Aktivitätstest (Lindigkeit, 1996, Kap. 2.10.1) eine hohe Empfindlichkeit aufweist, wurde dieses Detektionsprinzip für die Weiterentwicklung eines Analysenverfahrens verwendet. Die nur begrenzte Verfügbarkeit des radioaktiv markierten Senecionins machte den Einsatz von nicht radioaktiv markiertem Senecionin erforderlich, welches quantitativ bestimmbar ist. Für die Bestimmung der Aktivität der Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxygenasen (PNOs) wurde in einem Reaktionsansatz (s. u.) nicht markiertes Senecionin in einer definierten Konzentration eingesetzt (200  $\mu\text{M}$ ). Zur Detektion der *N*-Oxygenierung wurde das nicht radioaktiv markierte Senecionin mit einer geringfügigen Menge  $^{14}\text{C}$ -markiertem Senecionin unterfüttert (10 000 cpm).

Das eingesetzte Enzym setzte statistisch beide Substrate der homogenen Mischung in dem vorgelegten Verhältnis um. Das radioaktiv markierte Substrat Senecionin und das daraus gebildete

Senecionin *N*-Oxid konnten nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung mit dem Radio-DC-Scanner System RITA detektiert werden (Kap. 2.10.1). Für die Auswertung der Aktivität wurde das Verhältnis der beiden radioaktiven Substanzen bestimmt. Dieses konnte auf die bekannte Konzentration des nicht radioaktiv markierten Senecionins im Ansatz (200  $\mu$ M) übertragen werden, die dann die Quantifizierung erlaubte. Die Bestimmungen wurden in einem 10 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mM DTT, pH= 7,0 durchgeführt (vgl. Lindigkeit, 1996, Kap. 2.10.2).

#### Reaktionsansatz Unterfütterungstest

1. <sup>14</sup> C markiertes Senecionin in Methanol	10000 cpm		
Eintrocknen der Substratlösung			
		Volumen Konzentration im Ansatz	
		[μl]	[μM]
2. Probe in 10 mM Kaliumphosphatpuffer	3 – 50		
3. 2 mM Senecionin	10,0	200	
4. 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH= 7,0)	ad	87,5	
5. 2 mM NADPH in 10 mM Kaliumphosphatpuffer	12,5	250	
Gesamtvolumen	100,0		

Von Lösung 1. ( $^{14}\text{C}$ -markiertes Senecionin) wurde ein Volumen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) vorgelegt, welches eine Radioaktivität von 10 000 Zählimpulse/min (counts per minute, cpm) enthielt. Das Lösungsmittel Methanol wurde durch Verdunstung bei Raumtemperatur entfernt.

In das Reaktionsgefäß wurden dann die Lösungen 2. - 4. pipettiert und nach Mischen für 3 min bei +37°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Lösung 5. gestartet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 34  $\mu$ l 2 N HCl gestoppt und der Ansatz unter Luftstrom getrocknet. Dünnschichtchromatographische Trennung und Detektion erfolgte wie unter Kap. 2.10.1 beschrieben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 *N*-oxygenierende Arctiiden

Die Fähigkeit, enzymatisch tertiäre Pyrrolizidinalkaloide (PA) in das korrespondierende *N*-Oxid zu überführen, war zu Beginn dieser Arbeit bei einer Reihe von Insekten bereits gut untersucht. So konnten innerhalb der Lepidoptera in den Familien Arctiidae und Nymphalidae mit den Unterfamilien Danainae und Ithomiinae mehrere *N*-oxygenierende Vertreter identifiziert werden. Besonders die Familie der Arctiiden bot eine Reihe von Arten, deren *N*-Oxygenierung gut dokumentiert war (Biller, 1993, Hartmann, 1999, 2004a, Hartmann und Ober, 2000, Weller et al., 1999). Die bei dem Arctiiden *T. jacobaeae* hierfür verantwortliche Senecionin *N*-Oxygenase (SNO), eine Flavin-abhängige Monooxygenase (FMO), wurde bereits sowohl auf Proteinebene (Lindigkeit et al., 1997) als auch auf Nukleinsäureebene charakterisiert (Naumann et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die *N*-Oxygenierung von tertiären PAs bei

anderen Arctiiden ebenfalls auf eine Flavin-abhängige Monooxygenase oder ob sie wie bei der Metabolisierung der Isochinolinalkaloide durch *Drosophila mettleri* (Frank und Fogleman, 1992, Danielson et al., 1997) auf CYP450-Enzyme zurückgeführt werden kann. Aufgrund der vorliegenden molekularbiologischen Daten der SNO von *Tyria jacobaeae* (Naumann, 2003) konnte die Identifizierung und Charakterisierung von Flavin-abhängigen Monooxygenasen anderer Arctiiden vorgenommen werden.

### 3.1.1 Arctiinae

Erste molekularbiologische Untersuchungen sollten an nahen Verwandten von *T. jacobaeae* vorgenommen werden, die auch die Fähigkeit zur PA-N-Oxygenierung besitzen. Bei N-oxygenierenden Arctiiden konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit erwartet werden, dass sie ebenfalls über eine FMO verfügen, die für die N-Oxygenierung verantwortlich ist. Die potentiell N-oxygenierenden FMO's werden im folgenden bei allen untersuchten Arten als Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxygenase (PNO) bezeichnet. Hierfür wurden eine Reihe von Arctiiden erworben, die in dieselbe Unterfamilie (Arctiinae) eingruppiert werden (Weller et al., 1999). Die Hämolymphe dieser Arctiiden wurden vor der molekularbiologischen Untersuchung mit dem Qualitativen Aktivitätstest (Kap. 2.10.1) auf die Fähigkeit zur Bildung von N-Oxiden aus tertiären Pyrrolizidinalkaloiden geprüft. Folgende Arten wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht (Beschreibung und Fütterung der untersuchten Arten siehe auch Kap. 2.5.1 und 2.5.1.1):

Art	N-Oxygenierung von PA bereits bekannt	Nachweis der N-Oxygenierung
<b>Arctiinae</b>		
<i>Arctia cja</i> <sup>1</sup>	+	+
<i>Arctia villica</i>	-	+
<i>Grammia geneura</i>	-	+
<i>Hyphoraia aulica</i> <sup>2</sup>	-	+
<i>Pericallia matronula</i>	-	+
<i>Tyria jacobaeae</i> <sup>1</sup>	+	+
Qualitativer Aktivitätstest der N-Oxygenierung tertiärer Pyrrolizidinalkaloide (PA). Von den genannten Arten wurden ausnahmslos Hämolymphe-Proben von Raupen auf Aktivität geprüft (Kap. 2.10.1).		

<sup>1</sup> Biller, 1993, Lindigkeit, 1996

Für die Arten *A. villica*, *G. geneura*, *H. aulica* und *P. matronula* konnte erstmalig eine N-Oxygenierung tertiärer PA nachgewiesen werden. Für *G. geneura* wurde parallel zu dieser Arbeit die N-Oxygenierung bestätigt (Hartmann et al., 2004c, Hartmann et al., 2005).

#### *HYPHORAIA AULICA*<sup>2</sup>

Nachdem bei anderen Arten Hinweise auf eine Induzierbarkeit der enzymatischen Aktivität bestanden (Kap. 3.1.2), wurden die Raupen von *H. aulica* abweichend von einer Mischkost, die den anderen, untersuchten Arctiiden angeboten wurden (vgl. 2.5.1.1) und die PA-haltige Pflanzen in wechselnden Anteilen enthielt, gezielt mit PA-haltiger Nahrung angefüttert.

Direkt nach dem Schlüpfen wurden die Raupen mit Kunstfutter (Kap. 2.5.1.1) ohne Pyrrolizidinalkaloide für 4 Wochen aufgezogen. Im zweiten Schritt wurde das Kunstfutter mit gefriergetrockneten Blüten von *Senecio vernalis* versetzt. Die Raupen wurden über Nacht angefüttert. Um die Aufnahme des PA-haltigen Futters durch die Tiere sicherzustellen, wurde den Raupen zuvor für 28 h das Futter entzogen. Aufgrund der geringen Größe der zwei eingesetzten Raupen, die jeweils eine Länge von 1,2 cm und eine Masse von 54,8 bzw. 63,9 mg aufwiesen, konnten nur jeweils etwas mehr als 15 µl Hämolymphe gewonnen werden. Von dieser wurden jeweils 5 µl in einer Probe auf Aktivität getestet.

### 3.1.2 Lithosiinae

#### *Eilema albicosta*

*Eilema albicosta* gehört im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Arctiiden zur Unterfamilie der Lithosiinae, in der mehrere Gattungen von Flechtenbären zusammengefasst sind. Die bekannte Ernährung der Flechtenbären besteht aus nicht pyrrolizidinalkaloidhaltigen Flechten, so dass die Expression einer Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxygenase weder als sicher noch als notwendig für die Flechtenbären angesehen werden konnte. Für die Untersuchung konnten mehrere Raupen kurz nach dem Schlüpfen erhalten werden. Diese mussten aufgrund ihrer geringen Größe erst einmal mit Flechten als Futter (Kap. 2.5.1.1) weiter angezogen werden, so dass eine zur Untersuchung ausreichende Größe und somit Hämolympfemenge erzielt werden konnte. Für den qualitativen Aktivitätstest standen dann von sechs Tieren jeweils etwas mehr als 5 µl Hämolymphe zur Verfügung, die abweichend vom Kap. 2.10.1 direkt, ohne Umpuffern auf den 10 mM Kaliumphosphatpuffer, eingesetzt wurden.

Das Ergebnis fiel überraschend heterogen aus. Von den sechs untersuchten Tieren konnte bei drei Individuen keine Aktivität nachgewiesen werden. Bei den drei weiteren Proben konnte eine Aktivität nachgewiesen werden. Das radioaktive Senecionin wurde jedoch nur unvollständig umgesetzt. Die zur Kontrolle eingesetzten Hämolympheproben von *Arctia villica* zeigten mit einem fast vollständigen Umsatz deutlich Aktivität unter diesen Bedingungen.

Nur einige der Raupen von *E. albicosta* sind somit also in der Lage tertiäre Pyrrolizidinalkaloide in ihrer Hämolymphe zu N-oxygenieren, obwohl die Wachstumsbedingungen durch eine gemeinsame Haltung bzw. Fütterung gleich waren. Die Fähigkeit zur Umsetzung der tertiären Pyrrolizidinalkaloide ist bei den untersuchten Raupen von *E. albicosta* offenbar nicht bei allen Individuen und mutmaßlich nicht in gleichem Maße vorhanden. Durch die geringe Menge des vorgelegten Substrates und der langen Inkubationszeit besteht im Vergleich zu den Proben von *A. villica* eine nur geringe Gesamtaktivität.

Da das Futter der hier untersuchten Tiere keine Pyrrolizidinalkaloide enthielt, die die Expression des für die N-Oxygenierung verantwortlichen Enzyms hätten beeinflussen können, stellt sich die interessante Frage, ob sich die Aktivitäten bei den Raupen, die durch Nahrung PAs aufnehmen, im Vergleich von den Aktivitäten der Raupen unterscheiden, die mit einer PA-freien Kost aufgezogen werden. Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf die Möglichkeit hin, dass das hierfür verantwortliche Enzym nicht bei allen Individuen konstitutiv vorliegt und bei *E. albicosta* durch die Aufnahme von PAs induzierbar sein könnte. Für die Verifizierung dieser Hinweise sind allerdings weitere, quantitative Untersuchungen nötig.



### 3.2 Etablierung eines radioaktiven Unterfütterungstestes

Die Bestimmung von Aktivitäten mit dem etablierten Optischen Test (Lindigkeit, 1996, Kap. 2.10.2) erfordert relativ hohe Enzymaktivitäten. Dies erwies sich besonders bei nur geringer Probenmenge, wie sie z. B. bei *H. aulica* entnommen werden konnte (Kap. 3.1.1), als Problem. Im Falle der rekombinanten Enzyme, die mit dem *E. coli*-System (Kap. 2.8.1) exprimiert wurden, ergaben sich darüber hinaus durch die schlechte Löslichkeit der renaturierten Proteine messtechnische Probleme. Fielen diese während der Aufarbeitung oder einer Messung aus, so musste eine Verfälschung der Messwerte durch Streulicht erwartet werden. Die in *E. coli* exprimierte SNO von *T. jacobaeae* zeigte eine nur geringe spezifische Aktivität (Naumann et al., 2002), so dass für die in *E. coli* zu exprimierenden PNOs eine nur geringe Enzymaktivität erwartet werden musste. Um trotzdem Aktivitäten der rekombinanten Enzyme messen zu können, wurde ein Testverfahren benötigt, welches auch eine höhere Empfindlichkeit aufwies.

Für die Aktivitätsbestimmung bot sich deshalb an, die Detektion von radioaktivem Material als Messprinzip zu verwenden, weil hier im Vergleich zum Optischen Test eine deutlich höhere Empfindlichkeit besteht. Da die radioaktiven Substrate nur aufwendig in einer Zellkultur erzeugt werden können, lagen hier auch nur sehr geringe Mengen ausgewählter radioaktiver Pyrrolizidinalkaloide (Senecionin) vor. Durch deren Quantifizierung wäre bereits ein Großteil der Substrate verbraucht worden. Aufgrund der vorliegenden Mengen schloss sich deshalb eine Quantifizierung ausschließlich durch radioaktive Substrate wie bei Lindigkeit (1996) beschrieben aus. Für quantitative Aktivitätsmessungen wurde deshalb das radioaktive Analysenverfahren optimiert (Kap. 2.10.3). Bei diesem Testverfahren werden Substratlösungen mit nicht markierten Pyrrolizidinalkaloiden, deren Gehalt bestimmbar ist, mit einer nur geringen Menge an radioaktivem Substrat unterfüttert.

Für die Optimierung des Unterfütterungstests wurden mit Ammoniumsulfat gefällte, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefrorene Hämolympheproben von *T. jacobaeae* in dem 10 mM Kaliumphosphatpuffer (Kap. 2.10.3) zu ca. 100 mg/ml gelöst. Zur Entfernung von nicht gelösten Bestandteilen wurden die Lösungen 10 min bei 10000 Upm (Sorvall-Zentrifuge) zentrifugiert und der klare Überstand für den Unterfütterungstest eingesetzt. Für die Optimierung des Unterfütterungstests wurden Gesamtproteinmengen je 100 µl-Reaktionsansatz von 25 – 50 µg eingesetzt. Zur Aktivitätsmessung wurde der Unterfütterungstest als Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Die enzymatische Umsetzung wurde nach den Reaktionszeiten 4, 8 und 16 min abgestoppt und analysiert.

Die Analysenmethoden ergaben für die gleiche Hämolympheprobe mit spezifische Aktivitäten von 114 pkat/mg (Unterfütterungstest) und 123 pkat/mg (Optischer Test) vergleichbare Ergebnisse. Proben der heterolog exprimierten FMOs von *G. geneura* (Kap. 3.6.2) und *A. caji* (Kap. 3.6.1.2), die nur über geringe spezifische Aktivitäten verfügten, wurden daraufhin standardmäßig mit dem Unterfütterungstest untersucht.

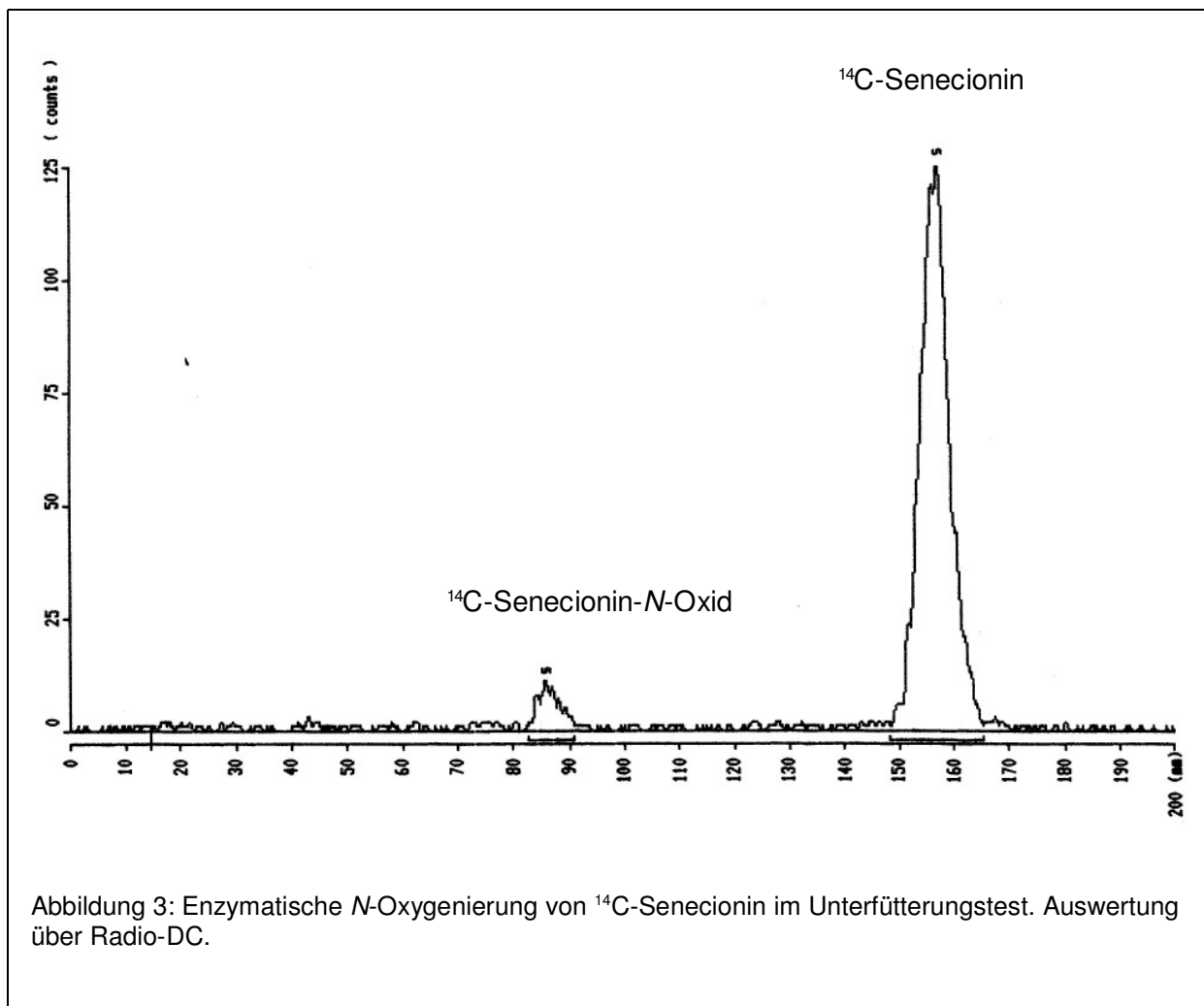


Abbildung 3: Enzymatische *N*-Oxygenierung von  $^{14}\text{C}$ -Senecionin im Unterfütterungstest. Auswertung über Radio-DC.

### 3.3 Molekulare Isolierung und Charakterisierung von Flavin-abhängigen Monooxygenasen in Arctiiden

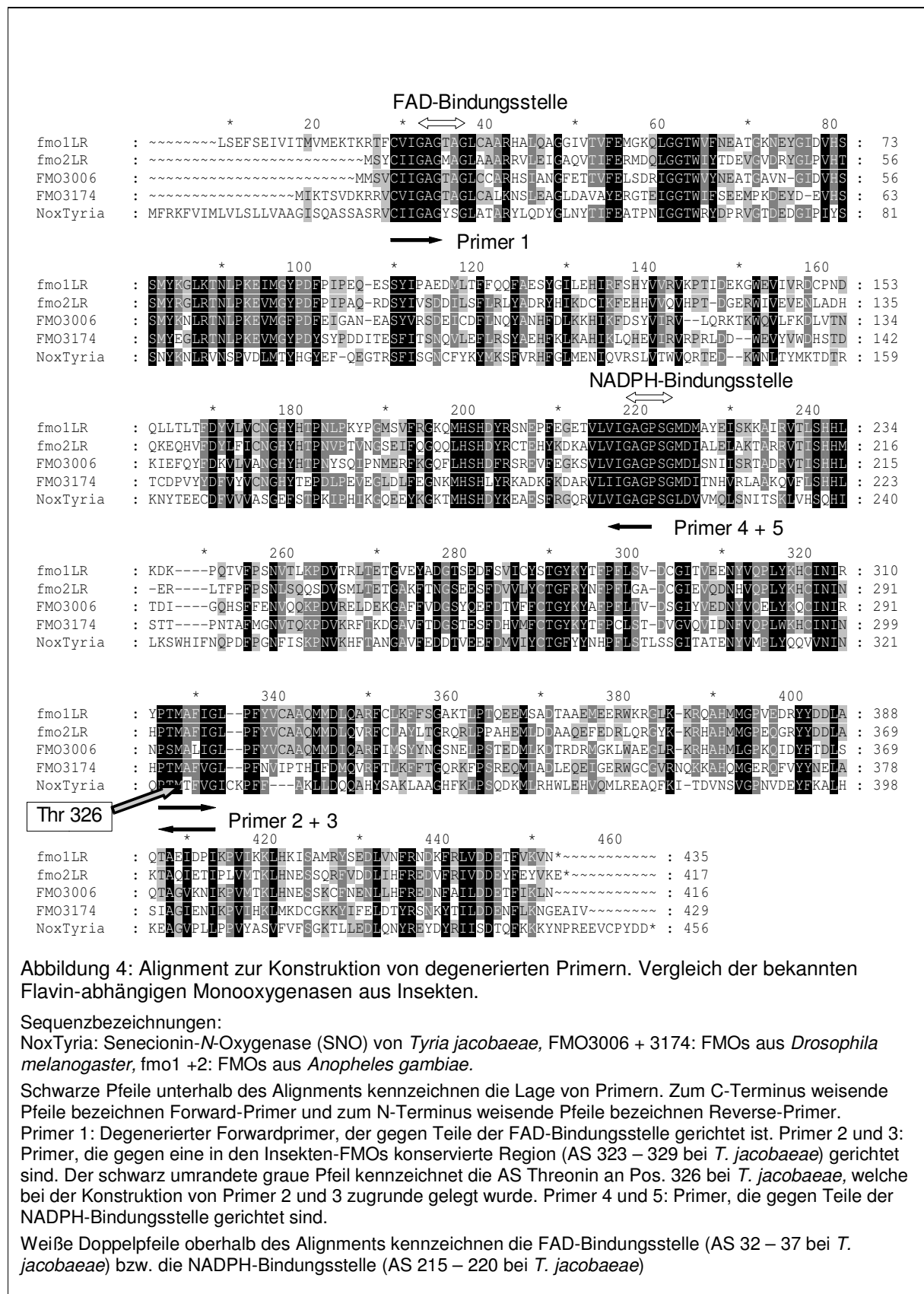
#### 3.3.1 Sequenzsuche mit der ersten Generation degenerierter Primer

Für die biochemische Isolierung und Charakterisierung der SNO aus *T. jacobaeae* war eine große Anzahl an Raupen nötig (Lindigkeit, 1996). Zur Identifizierung weiterer PNOs sollten eine Reihe von Arctiiden untersucht werden, die in praktisch allen Fällen nicht in einer derartigen Menge zur Verfügung standen. Deshalb sollten Isolierung und Identifizierung weiterer Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxygenasen (PNOs) anderer Arctiiden molekularbiologisch erfolgen. Für die Vervielfältigung bzw. Isolierung von weiteren PNOs wurde die PCR eingesetzt (Kap. 2.6.4.1). Hierfür mussten degenerierte Primer konstruiert werden (Kap. 2.6.4.2), die auch bei nicht bekannten aber homologen Sequenzen anderer Arctiiden zur Amplifizierung führen. Molekulare Sequenz-Informationen lagen allerdings zu Beginn dieser Untersuchung nur für die SNO von *T. jacobaeae* vor (Naumann, 2002).

Proteine sind aus einer Abfolge von Aminosäuren aufgebaut, die in verschiedene Sequenz-Motive unterteilt werden können. So weisen Proteine in aller Regel einige über die Artgrenzen hinweg hoch-konservierte, für die Funktionalität essentielle Sequenz-Motive auf. Andere Sequenz-Motive unterliegen einem ständigen Wandel durch Mutationen, ohne dass dies Auswirkungen auf die Funktionalität hat. Derartige Veränderungen in nicht konservierten Sequenzen können eine Änderung der Aktivität und Substratspezifität zur Folge haben, die zu einer Änderung der Aufgabe von Proteinen führen können.

Zur Vervielfältigung von bislang unbekannten PNOs durch die PCR mit degenerierten Primern sollten zu konstruierende Primer deshalb nur gegen konservierte, möglichst PNO-spezifische Sequenz-Motive gerichtet sein. Die Kenntnis von nur einer Sequenz lässt eine derartige Differenzierung in nicht oder nur wenig konservierte und hoch-konservierte PNO-Sequenz-Motive nicht zu. Die SNO aus *T. jacobaeae* konnte den Flavin-abhängigen Monooxygenasen (FMOs) zugeordnet werden (Lindigkeit, 1996). Vergleiche mit anderen Insekten-FMO-Sequenzen boten deshalb die Möglichkeit Sequenz-Motive zu erkennen, die innerhalb der Insekten-FMOs konserviert sind und somit als Matrize verwendet werden konnten.

Zu Beginn dieser Untersuchung lagen die Sequenzen von vier weiteren Flavin-abhängigen Monooxygenasen von Insekten vor (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Jeweils zwei FMOs unbekannter Funktion waren in den Genomen von *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae* gefunden worden. Durch Vergleich dieser fünf FMOs konnten mehrere konservierte Sequenz-Motive identifiziert werden, die innerhalb der Insekten-FMOs über die Artgrenzen hinweg eine hohe Übereinstimmung zeigten (Abbildung 4). Diese konservierten Regionen wurden als Matrize für die Konstruktion von degenerierten Primern eingesetzt (Abbildung 5), die die Amplifizierung der gesuchten PNO-Sequenz in verschiedenen Arten der Arctiiden ermöglichen sollten.



## Primer 1

5'- TG(CT) (AG)T(AGCT) AT(ACT) GG(AGCT) GC(AGCT) GG - 3'

Forwardprimer (768 x degeneriert), der gegen Sequenz-Abschnitte der FAD-Bindungsstelle gerichtet ist. Als Matrize wurde die Aminosäuresequenz von AS 29 – 34 (bezogen auf die Sequenz von *T. jacobaeae*, Abbildung 4) verwendet.

## Primer 2

5'- CC(AGCT) AC(AGCT) ATG (AG)CI TT(CT) (AG)T(AGCT) GG - 3'

Forwardprimer (512 x degeneriert), der gegen die über die Artgrenzen hinweg konservierte Region AS 323 - 329 (bei *T. jacobaeae*) gerichtet ist. Bei der Primersequenz wurde jedoch ausschließlich die Abweichung der SNO von *Tyria jacobaeae* (AS Threonin 326) berücksichtigt (Abbildung 4).

## Primer 3

5'- CC(AGCT) A(CT)(AG) AAI G(CT)C AT(AGCT) GT(AGCT) GG - 3'

Als Reverse-Primer (512 x degeneriert) gegen dieselbe konservierte Region wie Primer 2 konstruiert. Bei der Primersequenz wurde jedoch ausschließlich die Abweichung der SNO von *Tyria jacobaeae* (AS Threonin 326) berücksichtigt (Abbildung 4).

## Primer 4

5' - GG (AGCT)CC (AGCT)GC ICC (AGT)AT (AGT)AT - 3'

Reverse-Primer (192 x degeneriert) der gegen Teile der NADPH-Bindungsstelle gerichtet ist (AS 213 – 218 bei *T. jacobaeae*). Bei diesem Primer wurde am Ende die Aminosäure Isoleucin (Pos. 213) zugrunde gelegt, die im Vergleich bei nur einer Insekten FMO des 1. Alignments auftritt. Durch die Konstruktion von zwei degenerierten Primern (4 und 5) ließ sich der Grad der Degeneriertheit herabsetzen.

## Primer 5

5' - GG (AGCT)CC (AGCT)GC ICC (AGT)AT (AGCT)AC - 3'

Reverse-Primer (192 x degeneriert) der gegen Teile der NADPH-Bindungsstelle gerichtet ist (AS 213 – 218 bei *T. jacobaeae*). Bei diesem Primer wurde am Ende die Aminosäure Valin (Pos. 213) zugrunde gelegt, die im Vergleich bei allen anderen Insekten FMO des 1. Alignments auftritt. Durch die Konstruktion von zwei degenerierten Primern (4 und 5) ließ sich der Grad der Degeneriertheit herabsetzen.

Abbildung 5: 1. Generation degenerierter Primer anhand des 1. Alignments (siehe Abbildung 4).

I : Unspezifisch bindende Base Inosin.

Der genetische Code verwendet Kombinationen von drei Nukleinsäuren für die Determination der entsprechenden Aminosäure. Da bei der Mehrzahl der Aminosäuren mehrere Triplets für dieselbe Aminosäure codieren, spricht man von der Degeneriertheit des Genetischen Codes. Bei der Konstruktion von Primern aufgrund der Aminosäuresequenz kann deshalb die exakte Nukleinsäure-Sequenz nicht vorhergesagt werden. Für die Amplifizierung von unbekannten Sequenzen müssen jedoch die passenden Primer in einer PCR zur Verfügung stehen.

Deshalb wird ein Primergemisch synthetisiert, welches eine Primerpopulation aller möglichen Kombinationen für die codierende Nukleinsäuresequenz enthält. Die so hergestellten Primer werden als degenerierte Primer bezeichnet (Kap. 2.6.4.2). Je größer die Anzahl der Nukleinsäurekombinationen desto kleiner ist die Konzentration des unbekannten, passenden Primers, der sich während der Amplifizierung an die gesuchte cDNA anlagern soll. Die Konzentration des passenden Primers ist somit möglicherweise limitierend für die Amplifizierung der gesuchten Sequenzen. Deshalb ist bei der Konstruktion von degenerierten Primern darauf zu achten, dass konservierte Sequenzen ausgewählt werden, deren Aminosäuresequenz den Entwurf von Primern mit einem möglichst geringen Grad an Degeneriertheit ermöglichen. Da durch die Kenntnis nur weniger Flavin-abhängiger Monooxygenasen der Insekten und nur einer SNO der Lepidopteren nur wenige für die PNOs spezifische Sequenz-Informationen zur Verfügung standen, konnten nur Sequenzen ausgewählt werden, die innerhalb der FMOs konserviert sind. Die notwendiger Weise geringe Selektivität bot jedoch die Möglichkeit auch andere noch nicht

bekannte Flavin-abhängige Monooxygenasen zu isolieren und somit die Kenntnis über die Insekten-FMOs zu erweitern.

Für die Konstruktion von degenerierten Primern standen nicht nur eine geringe Anzahl an bekannten FMO-Sequenzen sondern auch nur wenige konservierte Sequenzregionen zur Verfügung (Abbildung 4). Deshalb mussten auch Sequenz-Motive ausgewählt werden, für die aufgrund der bestehenden Aminosäuresequenz eine größere Anzahl an Nukleinsäurekombinationen in Frage kommen (z. B. Primer 4 + 5, Abbildung 5). Bei den Primern 2 – 5 wurde deshalb an jeweils einer der Stellen im Primer, an denen alle vier Basen für die codierende Nukleinsäure-Sequenz möglich sind, die Base Inosin eingesetzt (vgl. Abbildung 5). Inosin kann unspezifisch, wenn auch mit unterschiedlichen Spezifitäten, mit sowohl Purin- als auch mit den Pyrimidinbasen (Wasserstoff-) Bindungen ausbilden, so dass eine Vervielfältigung mit der PCR möglich ist (Newton und Graham, 1994). Auf diese Weise wird die Anzahl der notwendigen Primer bzw. die Degeneriertheit reduziert.

Für den Bau von Primer 1 wurden Teile der FAD-Bindungsstelle von Aminosäure 29 – 34 und für Primer 2 und 3 eine konservierte Region von Aminosäure 323 – 329 unbekannter Funktion ausgewählt (Abbildung 4 und 5). Die Primer 1 und 3 wurden in einer Reihe von PCR-Ansätzen erfolgreich für die Amplifizierung der ersten Sequenzen in verschiedenen Semi-Nested-Verfahren eingesetzt (Kap. 3.3.3 und folgende). So konnten zwei Flavin-abhängige Monooxygenasen (Kap. 3.3.3 und 3.3.4) und die erste Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxygenase (Kap. 3.3.5) isoliert werden.

### 3.3.2 Benennungsschlüssel für die Arctiiden FMOs und PNOs

Für eine eindeutige Bezeichnung aller gefundenen FMOs wurden diese nach einem einheitlichen Benennungsschlüssel bezeichnet. Im ersten Teil der Bezeichnung werden die Initialen der lateinischen Gattungs- und Artbezeichnung vorangestellt. Hierbei wird der erste Buchstabe groß geschrieben. Die Zuordnung von gefundenen FMOs zu den Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxygenasen (PNOs) erfolgte vorläufig aufgrund der ermittelten Identitäten (74 - 93 %) zur SNO von *T. jacobaeae* (Kap. 2.6.11). Sequenzen, die sich jedoch deutlich in ihrer Identität von der SNO von *T. jacobaeae* unterschieden (Identitäten von 48 – 55 %) und trotzdem den Flavin-abhängigen Monooxygenasen zugeordnet werden konnten, wurden, da sie zueinander Identitäten von 85 – 90 % aufwiesen, als FMO-Gruppe zusammengefasst. Die Zugehörigkeit zu einer der beiden Gruppen ließ sich im Falle der PNOs an den Beispielen der SNO von *Tyria jacobaeae* und der PNO von *Grammiageneura* durch Aktivitätsbelegen (Kap. 3.5.1 und Kap. 3.3.5). Für alle weiteren Sequenzen muss die Zugehörigkeit noch durch Aktivitäten nachgewiesen werden. Zur Unterscheidung der zwei FMO-Teilsequenzen, die bei *T. jacobaeae* gefunden werden konnten (Kap. 3.3.10), wurden diese vorläufig als TjFMO1 bzw. TjFMO2 benannt.

## Benennung der gefundenen FMOs

AcFMO	FMO von <i>Arctia caja</i>
AvFMO	FMO von <i>Arctia villica</i>
TjFMO1	FMO1 von <i>Tyria jacobaeae</i>
TjFMO2	FMO2 von <i>Tyria jacobaeae</i>
AcPNO	mutmaßliche PNO von <i>Arctia caja</i>
AvPNO	mutmaßliche PNO von <i>Arctia villica</i>
GgPNO	PNO von <i>Grammiageneura</i>
PmPNO	mutmaßliche PNO von <i>Pericallia matronula</i>

3.3.3 FMO *Arctia caja*

Für die Identifizierung von PNOs der Arctiiden wurde zuerst der Generalist *Arctia caja* untersucht, der wie *T. jacobaeae* der Unterfamilie der Arctiinae zugeordnet wird (Weller et al., 1999). Aufgrund der relativ nahen Verwandtschaft dieser beiden Arctiiden konnte mit den degenerierten Primern, die sich bei Differenzen der für den Bau von degenerierten Primern ausgewählten Sequenz-Motive (Kap. 3.3.1, Abbildung 4 und 5) stärker an der Proteinsequenz der SNO von *T. jacobaeae* als an den FMOs von *D. melanogaster* und *A. gambiae* orientierten, noch am ehesten ein Erfolg erwartet werden. Da für die SNO von *T. jacobaeae* der Fettkörper als Hauptexpressionsort identifiziert werden konnte (Naumann, 2003), wurde von *Arctia caja* aus dem Fettkörper Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.6.2) und diese mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.6.3). Mit folgendem Temperaturprogramm konnte erfolgreich eine spezifische Bande amplifiziert werden:

TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION EINES ERSTEN FRAGMENTES DER FMO VON *A. CAJA* MIT DEGENERIERTEN PRIMERN

+ 94°C	2 min	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 52,7°C	1 min	
+ 72°C	2 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	

Für die Amplifizierung wurde ein zweistufiges Semi-Nested-Verfahren (Kap. 2.6.4.2) eingesetzt, um die Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt zu erhöhen. Beide Nested-Schritte erfolgten unter Verwendung desselben Temperaturprogramms (s.o.). Im ersten Schritt wurde 1 µl der hergestellten cDNA (Kap. 2.6.3) mit den Primern 1 (S. 57, Abbildung 5) und Oligo(dT) (Kap. 2.4) in der PCR eingesetzt und so theoretisch alle cDNA-Fragmente, die eine zu dem Primer 1 passende FAD-Bindungsstelle aufwiesen, vervielfältigt. Das so erhaltene Gemisch von PCR-Produkten wurde mit 10 mM Tris-Puffer 1:100 verdünnt und dann direkt in einer weiteren PCR mit den Primern 1 und 3 (Kap. 3.3.1, Abbildung 5) eingesetzt. Auf diese Weise wurden Amplifikate erhalten, die neben einer FAD-Bindungsstelle auch das innerhalb der bekannten Insekten-FMOs konservierte Sequenz-Motiv passend zum Primer 3 haben.

Bei der Verwendung von Primer 1 und 3 in der PCR konnte für PCR-Produkte einer cDNA deren Gen dem der SNO von *T. jacobaeae* ortholog ist und dieselbe Funktion erfüllt, erwartet werden, dass im codierenden Bereich nur geringe Abweichungen bestehen und deshalb bei Vervielfältigung eines spezifischen Amplifikates dieses annähernd die gleiche Sequenzlänge von ca. 900 bp aufweisen sollte (Kap. 3.3.1, Abbildung 4). Nach Vervielfältigung einer spezifischen Bande mit ca. 900 bp wurde diese kloniert (Kap. 2.6.5) und sequenziert (Kap. 2.6.11). Nach Auswertung mit der GCG-Software (Kap. 2.6.11) und Vergleich mit den bekannten Insekten-FMOs konnte das gefundene Fragment als Teil einer FMO-Sequenz identifiziert werden. Für die Amplifikation des fehlenden 3'-Endes der cDNA wurde der sequenzspezifische Primer 14 (Abbildung 6) passend zu Teilsequenzen der cDNA des gefundenen Fragments konstruiert und mit dem Oligo(dT)-Primer (Kap. 2.4) in dem folgenden Temperaturprogramm eingesetzt:

TEMPERATURPROGRAMM FÜR DIE AMPLIFIKATION DES 3'-ENDES DER FMO VON *A. CAJA*

+ 94°C	2 min	}	30 Zyklen, in denen die Annealingtemperatur um 0,5°C je Zyklus verringert wurde.
+ 94°C	45 sec		
+ 65°C - + 50°C	1 min		
+ 72°C	4 min		
+ 94°C	45 sec	}	5 Zyklen
+ 50°C	1 min		
+ 72°C	4 min		
+ 72°C	10 min		
+ 15°C	∞		

Eine spezifische Bande von ca. 1250 bp wurde kloniert (Kap. 2.6.5) und nach Sequenzierung als fehlendes 3'-Ende identifiziert (Kap. 2.6.11). Für die Amplifizierung des 5'-Endes der cDNA wurden die 5'-RACE-Primer 11 – 13 passend zu Teilsequenzen des gefundenen FMO-Fragments entworfen (Abbildung 6). Das fehlende 5'-Ende der cDNA konnte mit den Primer 11 – 13 und einem Ankerprimer mit der 5'-RACE-Technik nach folgendem Temperaturprogramm amplifiziert werden (Kap. 2.6.4.3).

TEMPERATURPROGRAMM FÜR DIE AMPLIFIKATION DES 5'-ENDES DER FMO VON *ARCTIA CAJA*

+ 94°C	2 min	}	35 Zyklen
+ 94°C	45 sec		
+ 58,1°C	1 min		
+ 72°C	2 min		
+ 72°C	10 min		
+ 15°C	∞		

Die gefundenen Teilsequenzen wurden unter Verwendung der GCG-Software ausgewertet (Kap. 2.6.11) und zu der vollständigen Sequenz zusammengesetzt. Die erhaltene cDNA bzw. die daraus resultierende Proteinsequenz von *A. caja* konnte nach Vergleich mit den bekannten Insekten-FMOs als FMO identifiziert werden. Die cDNA hat eine Gesamtlänge von 1662 bp, von denen 1356 eine Sequenz von 451 Aminosäuren codieren (Abbildung 7, S. 63). Die FMO von *A. caja* ist somit nur um 5 Aminosäuren kürzer als die SNO von *T. jacobaeae*. Am 5'-Ende verfügt die cDNA über einen nicht codierenden Bereich von 81 bp. Der nicht codierende Bereich am 3'-Ende beträgt 225 bp. Nach Analyse mit SignalP (Kap. 2.6.11) konnte eine N-terminale Signalsequenz mit Schnittstelle



zwischen AS 18 und 19 vorhergesagt werden. Für das unprozessierte Protein mit Signalsequenz wurde eine Molekularmasse von 51,4 kDa mit einem Isoelektrischen Punkt (IEP) von 7,2 vorhergesagt (ProtParam, Kap. 2.6.11). Nach Entfernung der Signalsequenz ergab die Untersuchung der Proteinsequenz eine Molekularmasse von 49,4 kDa und einen IEP von 7,0.

Durch Vergleich mit den anderen Insekten-FMOs (Kap. 3.3.1, Abbildung 4) konnten konservierte Sequenz-Motive wie die Nukleotidbindungsstellen für FAD und NADPH (GxGxxG/A) identifiziert werden (Abbildung 7). Die FAD-Bindungsstelle besteht aus dem Sequenz-Motiv -GAGYSG- an Aminosäureposition (AS) 35 – 40. In Übereinstimmung mit der SNO von *T. jacobaeae* und der FMO von *S. cerevisiae* verfügt die FMO von *A. caja* über ein Sequenz-Motiv von Aminosäure 219 – 224 (- GAGPSA -), welches als Bindungsstelle für das NADPH identifiziert werden konnte (vgl. Suh et al., 1999b).

Primer 11	1. Genspezifischer Primer [GSP1] für die cDNA-Synthese	
5' - CTG AAT TTT AGC ATC TAA A - 3'		$T_m = + 45,9^{\circ}\text{C}$
Primer 12	GSP2 der 5'-RACE	
5' - TTG ATG AGG TGA GCA GCA AGG TCA AA - 3'		$T_m = + 63,2^{\circ}\text{C}$
Primer 13	GSP3 der 5'-RACE	
5' - TCG TGA CTG TGT AGC ATC TTT CCT TTA - 3'		$T_m = + 62,2^{\circ}\text{C}$
Primer 14	3'-RACE-Primer	
5' - GTG ACA ATT GGA AGG TGA CAT ATA T - 3'		$T_m = + 58,1^{\circ}\text{C}$
Abbildung 6: RACE-Primer für die Identifizierung der cDNA der FMO von <i>Arctia caja</i>		

Auffallend war jedoch die mit 48,4 % relativ geringe Identität auf Aminosäureebene der FMO von *A. caja* zur SNO von *T. jacobaeae*, die sich neben Unterschieden in nicht konservierten Regionen auch durch eine Lücke von sechs Aminosäuren (zwischen AS 252 und 253, s. Abbildung 13, S. 74) widerspiegelt. Zu den bekannten FMO-Sequenzen von *Drosophila* besteht mit der FMO von *A. caja* eine nur geringe Identität von 35 % auf Aminosäureebene.

Für die Flavin-abhängigen Monooxygenasen der Säuger konnten jedoch für Proteinsequenzen orthologer Gene Identitäten von mehr als 80 % gefunden werden (Cashman, 1995). Zwischen Enzymsequenzen paraloger Gene der Säuger-FMOs bestehen hingegen Identitäten im Bereich von 50 – 58 %. Die errechneten Identitäten für die SNO von *T. jacobaeae* und *A. caja* ließen deshalb Zweifel aufkommen, ob die gefundene FMO-Sequenz die gesuchte PNO war. Zur Beantwortung dieser Frage muß die Funktion der FMO von *A. caja* noch durch ihre enzymatische Aktivität belegt werden. Darüber hinaus waren noch weitere Sequenzen anderer Arctiden zu identifizieren (Kap. 3.3.4 und ff.) und deren Aktivität zu charakterisieren. Für eine eindeutige Bezeichnung aller gefundenen FMOs wurden diese nach einem einheitlichen Benennungsschlüssel bezeichnet (Kap. 3.3.2). Die erste gefundene FMO von *Arctia caja* wurde somit als AcFMO benannt.

Nach Analyse der AS-Sequenz von AcFMO mit SignalP 3.0 (Kap. 2.6.11) konnte eine N-terminale Signalsequenz vorhergesagt werden, deren Schnittstelle zwischen Aminosäure 18 und 19 liegt. Nach Analyse mit der Software TargetP 1.1 (Kap. 2.6.11) konnte für die Signalsequenz mit der höchsten Wahrscheinlichkeit eine Adressierung für den vesikulären Transport vorhergesagt werden. Mit einer deutlich geringeren Wahrscheinlichkeit führt die Signalsequenz zu einer Translokation in Mitochondrien. Andere Signalsequenzen, welche z. B. in die Peroxisomen dirigieren (wie z. B. die C-Terminale Signalsequenz -Ser-Lys-Leu-) oder zu einer Retention im Endoplasmatischen

Retikulum führen könnten (wie z. B. die C-terminale Aminosäuresequenz -Lys-Asp-Glu-Leu-), konnten nach Analyse mit PSORT II (Kap. 2.6.11) nicht nachgewiesen werden. Die Analyse einer potentiellen Funktion mit ProtFun 2.2 (Kap. 2.6.11) wurde mit einer gleich hohen Wahrscheinlichkeit Transport bzw. Bindungsfunktionen und eine Assoziation mit der Plasmamembran prognostiziert. Durch die Analyse mit TMHMM 2.0 konnten jedoch keine Transmembran-Helices nachgewiesen werden, die zu einer Retention in einer Biomembran führen könnten.

Für die FMO von *A. caja* konnten mehrere posttranslationale Modifikationen prognostiziert werden. So verfügt die FMO über fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen 14, 53, 165, 233 und 394. O-Glykosylierungen, die an Aminosäuren wie Serin oder Threonin erfolgen können, konnten nach Analyse mit NetOGlyc 3.1 (Kap. 2.6.11) nicht nachgewiesen werden. Als mutmaßliche Phosphorylierungsstellen kommen eine Vielzahl von Positionen in Frage (NetPhos 2.0, Kap. 2.6.11) von denen die Aminosäuren Serin 145, 167, Threonin 26, 70, 373 und Tyrosin 436 mit der höchsten Wahrscheinlichkeit prognostiziert werden. Andere Modifikationen wie die Entfernung des Start-Methionins und nachfolgende N-Acetylierung der zweiten Aminosäure, wie für humane FMOs (FMO 1-3) angenommen (Cashman, 1995), konnten jedoch nicht prognostiziert werden (Kap. 2.6.11, NetAcet 1.0). Die mutmaßlichen posttranslationalen Modifikationen könnten eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Konformation und Löslichkeit extrazellulärer FMOs spielen.

Die aufgrund der Sequenz-Informationen für AcFMO vorhergesagten Eigenschaften sind vergleichbar mit denen der SNO von *T. jacobaeae* (Lindigkeit, 1997). So konnten die Nukleotid-Bindungssequenz für FAD bzw. NADPH identifiziert werden. Auch die vorhergesagte Größe von 49,4 kDa für das prozessierte Protein ist mit den mittels SDS-PAGE bestimmten Größen für die Untereinheiten der nativen SNO von *T. jacobaeae* mit 51,5 kDa bzw. 50,5 kDa vergleichbar. Aufgrund der Vorhersage mit verschiedenen Computerprogrammen (s. o.) ist die gefundene AcFMO mit hoher Wahrscheinlichkeit ein extrazelluläres Protein. In Verbindung mit den Sequenz-Übereinstimmungen (s. o.) konnte deshalb davon ausgegangen werden, dass es sich bei der gefundenen Sequenz um eine lösliche, extrazelluläre Flavin-abhängige Monooxygenase handelt.

```

1  TGATCTCAACGCTTCGTCGATCGCTACATCTGTATAACACTCACAATTCGTTTTAAGC 60
61 TGTACTGTTGACTAATTTACAATGGGACATCGGACGTGTTTAATATTTTGTGTTTATA 120
1  M G H R T C L I F L C L L 13

121 AATTATTCGCAAGGAGTCTATATGCTATCACAATTGACCTCAAGACCCCGCGTTTGCATC 180
14 N Y S Q G V Y M L S Q L T S R P R V C I 33
Primer 1
181 ATCGGTGCTGGCTACTCGGCGCTGGCCACGGCCCGTCACATGATCGACTATGGCCTCAAC 240
34 I G A G Y S G L A T A R H M I D Y G L N 53
FAD-Bindungsstelle
241 TTAACGTGTTTGAGGTTCCCAACTACATCGGAGGCCTTGGAGATACACTCCTCGTGTC 300
54 L T V F E V P N Y I G G T W R Y T P R V 73

301 GGCAGTATGAGTATGGAGCACCTTGTTCACGAGCGCTACAAGGACTTGAGAACAAC 360
74 G T D E Y G A P L F T S A Y K D L R T N 93

361 TCCTTCATCCGACGATGGAATTGCCCGACTACCCGTTTCCCGCAGGTCCTGTATCTTCA 420
94 S F Y P T M E L P D Y P F P A G P V S S 113

421 TTTCTTCTGGGCCCTGTATTTACAAGTATTTGGAAGGTTATACTAAGCAATTCATTTA 480
114 F L S G P C I Y K Y L E G Y T K Q F N L 133

481 AAAAAATACATTCAATTCGAAGCCTGGTAACCAAGTGTGGAGAAGGTGGGTGACAATTGG 540
134 K K Y I Q F R S L V T S V E K V G D N W 153

541 AAGGTGACATATATGAAGACTGATACGAAGCAGAACGTGTGAGGAAATGTAGCTTCGTT 600
154 K V T Y M K T D T K Q N V S E E C S F V 173

601 GTCGTTGCAAACGGGGAGTACACCGCGCCCATGTACCTTACTTCGCAAAAACAAGAAGAC 660
174 V V A N G E Y T A P H V P Y F A K Q E D 193

661 TTTAAAGGAAAGATGTACACAGTCACGATTACAGAGATTCCGAAGACTACCGGGGTCTA 720
194 F K G K M L H S H D Y R D S E D Y R G L 213

721 CGAGTACTGGTGGTAGGAGCCGCCCTTCTGCGTTTGACCTTGCTGCTCACCTCATCAAC 780
214 R V L V V G A G P S A F D L A A H L I N 233
NADPH-Bindungsstelle
781 GTGACCTCTATGTTTCATACATAGTCATCATTAGATGCTAAAATTCAGAAGGTTTATGGC 840
234 V T S M F I H S H H L D A K I Q K V Y G 253
„Lücke“
841 AACTATAAAAGGAAACAGACATAAAGCATTTCACACCAACGGGGCTGTATTTGTGGAC 900
254 N Y K R K P D I K H F T P T G A V F V D 273

901 GACACCACTGAACAGTTTCGATGTTGTGCTATACTTTGCACAGGTTATAGCTACAGCTTCCCC 960
274 D T T E Q F D V A I L C T G Y S Y S F P 293

961 TTCCTCAACTATCAGTCTTCTGGAGTGACGTCGTCAGCGAAATATATAATGCCACTGTAC 1020
294 F L N Y Q S S G V T S S A K Y I M P L Y 313
Primer 3
1021 AATCAACTTATAAACATTAATCACCCCACTATGACGTTTGTGGGAAGTGGAAAATATTCT 1080
314 N Q L I N I N H P T M T F V G T G K Y S 333
konservierte Region AS 322 – 328
1081 ATTGGATTAGTTTCGAGATAGGCAGGGTCACTACTCAGCACAATTAGCGGCAGGGCTGGTT 1140
334 I G L V R D R Q G H Y S A Q L A A G L V 353

1141 AAGCTACCGTCTAAAGATGAAATGTTCCAGGAGTGGTTCGATCACGCAAAACACCAGACA 1200
354 K L P S K D E M F Q E W F D H A K H Q T 373

1201 CCCAAAGAAATTAATCTTATTGGGTACGAAAATACGGCCAATTATATGGCACTCTTCTC 1260
374 P K E I N L I G Y E N T A N Y M D T L L 393

1261 AACGGAACAGATATTCCTGGCGTTCCTAGTTTTTTACAACATTTCTGCGAAACCACATA 1320
394 N G T D I P G V P L V F T T I L R N H I 413

1321 GATCTTTGGTACACGGAGTTTTTAACATTTAGAAAATTATCAAATAAACTTATTAAATGAT 1380
414 D L W Y T E F L T F R N Y Q I N L L N D 433

1381 ACGGAATATGAAATGATTGTCAAACACAGAAGAAAATTTGTCCATTGATTATATAATC 1440
434 T E Y E M I V K P Q K K I C P F D L * 451

1441 GTGTGTTTATTTATATGATAGAGAATTGCCACATATAATTTAAAAAATGTACCTAATTA 1500
1501 TTAGATTTTATACAAAGTCAACATTACAGTCTATTGCATACTTAAATTGTGTTCTATTTC 1562
1561 TAGCACTGATAACCAAGATGTCAGTACTTCTTCGTTTAAAAATGTACTTGAGCTCAT 1622
1621 ATTAAAAATTGAAATAAACTGTATTGTCCTTCGAAAAAATAA 1662

```

Abbildung 7 cDNA- und Proteinsequenz der FMO von *Arctia caja*: N-terminale Signalsequenz von Aminosäure (AS) 1 – 18 (fett). FMO-typische Sequenz-Motive wie die FAD-Bindungsstelle von AS 35 – 40 und die NADPH-Bindungsstelle von AS 219 – 224 konnten auch bei AcFMO (Proteinsequenzen fett und kursiv) gefunden werden. Die SNO von *T. jacobaeae* (vgl. Abbildung 4, S. 56 und Abbildung 13, S. 74) verfügt über ein zusätzliches Sequenz-Motiv von 6 AS („Lücke“ bei den *Arctia*-FMOs zwischen AS 252 und 253). Innerhalb der (vergleichenen) Insekten besteht eine konservierte Region von AS 322 – 328 (kursiv), die für die Konstruktion von Primer 2 + 3 (unterstrichen) verwendet wurde.

### 3.3.4 FMO *Arctia villica*

Durch die relativ geringe Identität der gefundenen FMO von *A. caja* zur SNO von *T. jacobaeae* (Kap. 3.3.3) kamen Zweifel auf, ob es sich bei der FMO von *A. caja* um die gesuchte PNO handelt. Für die Identifizierung der cDNA der PNO einer weiteren Arctiiden-Art wurde mit *Arctia villica* eine weitere Art der Gattung *Arctia* ausgewählt. Da für die SNO von *T. jacobaeae* der Fettkörper als Hauptexpressionsort identifiziert wurde (Naumann, 2003) und die cDNA der FMO von *A. caja* aus dem Fettkörper isoliert werden konnte (Kap. 3.3.3), wurde Gesamt-RNA aus dem Fettkörper von *A. villica* isoliert (Kap. 2.6.2) und in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.6.3).

Zur Erhöhung von Ausbeute und Spezifität wurde das Semi-Nested-Verfahren eingesetzt (Kap. 2.6.4.2). Im ersten Schritt wurden die Primer 1 (Kap. 3.3.1, Abbildung 4 und 5) und Oligo(dT) (Kap. 2.4) für die Amplifizierung verwendet (1. Stufe). Das so erhaltene Gemisch von PCR-Produkten wurde mit 10 mM Tris-Puffer 1:100 verdünnt und dann direkt in einer weiteren PCR mit den Primern 1 und 3 eingesetzt (Abbildung 5). Unter Verwendung eines Temperaturprogramms mit konstanter Annealingtemperatur (s. u.) konnte eine spezifische Bande von ca. 900 bp amplifiziert werden, die mit der nach der SNO-Sequenz erwarteten Länge übereinstimmte (vgl. Kap. 3.3.1, Abbildung 4). Die Verdünnung der PCR Produkte von Stufe 1 wurde darüber hinaus in einem Parallel-Ansatz mit dem Primerpaar 2 (Kap. 3.3.1, Abbildung 4 und 5) und Oligo(dT) für die Amplifizierung verwendet. In dem Parallel-Ansatz konnte eine spezifische Bande von ca. 650 bp erhalten werden. Beide Amplifikate wurden kloniert (Kap. 2.6.5) und sequenziert (Kap. 2.6.11).

TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIZIERUNG EINES INTERNEN FRAGMENTS UND DES 3'-ENDES DER FMO VON *A. VILICA* MIT DEGENERIERTEN PRIMERN

+ 94°C	<u>2 min</u>	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 52,4°C	1 min	
+ 72°C	<u>3 min</u>	
+ 72°C	<u>10 min</u>	
+ 15°C	∞	

Nach Sequenzierung des 900 bp großen PCR-Produktes konnte dieses als Mittelstück einer Flavin-abhängigen Monooxygenase identifiziert werden, welches über eine hohe Übereinstimmung zur bereits identifizierten FMO von *A. caja* verfügt. Die Sequenzierung des zweiten Amplifikates ergab im Vergleich zur FMO von *A. caja* ebenfalls ein hohes Maß an Übereinstimmung und konnte somit als vollständiges 3'-Ende einer Arctiiden-FMO identifiziert werden. Die Überschneidung der beiden Teilsequenzen von *A. villica* beschränkt sich nur auf die Primer-Bindungsstelle, die sowohl für den Reverse-Primer des Mittelstückes als auch für den Forward-Primer des 3'-Endes als Matrize diente (Kap. 3.3.1).

Für die Identifizierung des fehlenden 5'-Endes der cDNA wurden die genspezifischen Primer 15 – 17 konstruiert (Abbildung 8) und in der 5'-RACE eingesetzt (Kap. 2.6.4.3). Mit dem nachfolgend aufgeführten Temperaturprogramm konnte eine spezifische Bande von ca. 210 bp amplifiziert werden, welche nach Klonierung (Kap. 2.6.5) und Sequenzierung (Kap. 2.6.11) als fehlendes 5'-Ende identifiziert werden konnte.

# TEMPERATURPROGRAMM FÜR DIE AMPLIFIKATION DES 5'-ENDES DER FMO VON *A. VILLICA*

+ 94°C	2 min	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 58,7°C	1 min	
+ 72°C	4 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	

Primer 15	1. Genspezifischer Primer (GSP1) für die cDNA-Synthese	
5' - GTA AGG TAC ATG GGG CAC AAT - 3'		$T_m = + 57,9^{\circ}\text{C}$
Primer 16	GSP2 der 5'-RACE	
5' - GAC TTC GGA ATT GAA TAT ATT TTT CCA AAT - 3'		$T_m = + 58,6^{\circ}\text{C}$
Primer 17	GSP3 der 5'-RACE	
5' - GGC AAT TCC ATC GTC GGA TAG AAA GA - 3'		$T_m = + 63,2^{\circ}\text{C}$

Abbildung 8: 5'-RACE-Primer für die Identifizierung der cDNA der FMO von *Arctia villica*

Die nach Auswertung mit der GCG-Software zusammengesetzte Sequenz von *A. villica* hat eine Gesamtlänge von 1675 bp (Abbildung 9). Eine Sequenz von 1353 Basen codiert in Übereinstimmung mit der FMO von *A. caja* für ein 451 Aminosäuren langes Protein, für das unprozessiert eine Molekularmasse von 51,4 kDa und ein Isoelektrischer Punkt (IEP) von 6,9 errechnet werden konnte (ProtParam, Kap. 2.6.11). Am 5'-Ende verfügt die cDNA über einen nicht codierenden Bereich von 93 bp. Der nicht codierende Bereich am 3'-Ende beträgt 230 bp. In Übereinstimmung mit der FMO von *A. caja* konnte nach Analyse mit SignalP (Kap. 2.6.11) eine N-terminale Signalsequenz von AS 1- 18 identifiziert werden. Für das potentiell prozessierte Protein konnte eine Molekularmasse von 49,3 kDa und ein IEP von 6,7 bestimmt werden.

Die FMO von *A. villica* verfügt neben den beiden Nukleotid-Bindungssequenzen für FAD (AS 35 – 40) und NADPH (AS 219 – 224) über eine hohe Übereinstimmung zur FMO von *A. caja* mit 92,3 % und konnte somit als Flavin-abhängige Monooxygenase identifiziert werden. Zur SNO von *T. jacobaeae* besteht jedoch eine nur geringe Identität von 48,1 %. Nach der Analyse der FMO-Sequenz mit den verschiedenen Programmen (vgl. Kap. 2.6.11 und Kap. 3.3.3) zeigten sich mehr Übereinstimmungen mit der FMO von *A. caja* als zur SNO von *T. jacobaeae*. So konnte auch bei der FMO von *A. villica* mit SignalP 3.0 eine mutmaßliche, N-terminale Signalsequenz identifiziert werden, die eine vorhergesagte Schnittstelle zwischen den Aminosäuren 18 und 19 hat. Die Adressierung der Sequenz erfolgt mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für den vesikulären Transport. Mit einer deutlich geringeren Wahrscheinlichkeit kann die FMO von *A. villica* durch die N-terminale Signalsequenz jedoch in die Mitochondrien dirigiert werden (TargetP 1.1). Da weder Signalsequenzen, die die gefundene FMO z. B. in die Peroxisomen dirigieren könnten (PSORT II, Kap. 2.6.11), noch intramolekulare Transmembran-Helices vorhergesagt wurden (TMHMM 2.0, Kap. 2.6.11), ist die FMO von *A. villica* mit hoher Wahrscheinlichkeit ein lösliches, extrazelluläres Enzym.

Für die FMO von *A. villica* konnten potentielle Asparagin-Glykosylierungen an den Positionen 53, 154, 233 und 394 bestimmt werden. Als potentielle Phosphorylierungsstellen konnte eine Vielzahl von Positionen bestimmt werden, von denen die grösste Wahrscheinlichkeit auf die Positionen Serin 145, 167, 275, 304, Threonin 70, 162, 373 und Tyrosin 308 und 436 entfällt. Andere Modifikationen wie die Entfernung des Start-Methionins und nachfolgende N-Acetylierung der zweiten Aminosäure, wie für humane FMOs (FMO 1-3) angenommen (Cashman, 1995), konnten jedoch nicht prognostiziert werden (Kap. 2.6.11, NetAcet 1.0).

Mit den nach Kap. 3.3.1 konstruierten, degenerierten Primern konnte bei *A. villica* eine weitere Flavin-abhängige Monooxygenase identifiziert werden. Die molekularbiologischen Ergebnisse zeigen eine höhere Übereinstimmung zur FMO von *A. caja* als zur SNO von *T. jacobaeae* (s. o.). Parallel hierzu wurden die degenerierten Primer (Kap. 3.3.1, Abbildung 5) bei *Grammia geneura* zur Isolierung einer PNO verwendet (Kap. 3.3.5).

```

1 GGGAGTTCAGTACCGATCACAAACGCTTTGCCGATCGCTACGTCTGTATAACATTCACAT 60
61 TTCGTCTTAACGTGTACTGTTGACTAATTTGCAATGGGACATCGGACGTGTGTAATATTT 120
      M G H R T C V I F 9

121 TTATGTTTATTTAATTATTTGCCAGGAGGCTATATGCTACAACAATCTGCCTCAAGACCC 180
10 L C L F N Y L P G G Y M L Q Q S A S R P 29
      Primer 1
181 CGCGTTTGGCTCATCGGTGCTGGCTACTCGGGCCTGGCCACGGCCCGTCACATGATCGAC 240
30 R V C V I G A G Y S G L A T A R H M I D 49
      FAD-Bindungsstelle
241 TATGGCCTCAACTTAACGTATTTGAGGCTCCAACTACATCGGAGGCACTTGGAGATAC 300
50 Y G L N L T V F E A S N Y I G G T W R Y 69

301 ACTGCTCGTGTGGCACTGATGAGTATGGAGCACCTTGTTTACAAGCGCGTACAAGGAC 360
70 T A R V G T D E Y G A P L F T S A Y K D 89

361 TTAAGAACAACTCTTTCTATCCGACGATGGAATTGCCCGACTACCCGTTCCCTGCGGGT 420
90 L R T N S F Y P T M E L P D Y P F P A G 109

421 CCTGTATCTTCATTCTTTCTGGGCCCTGTATTTACAAGTATTTGGAAGGTTATACTAAG 480
110 P V S S F L S G P C I Y K Y L E G Y T K 129

481 CAATTCATTGGAAAAATATATTCAATCCGAAGTCTGGTAACCACTGTGGAGAAGGTG 540
130 Q F N L E K Y I Q F R S L V T S V E K V 149

541 GGTGACAATTGGAACGTGACATATATGAAGACTGATACGAAGAAGACGTGTCAGAGGAA 600
150 G D N W N V T Y M K T D T K K N V S E E 169

601 TGTGGCTTCGTTTGTGCTGCAACGGGGAGTACATTGTGCCCCATGTACCTTACTTTGCA 660
170 C G F V V V A N G E Y I V P H V P Y F A 189

661 AAACAAGAAGACTTTAAAGGAAAGATACTACACAGTCACGATTACAGAGATTCCGAAGAT 720
190 K Q E D F K G K I L H S H D Y R D S E D 209

721 TACCGTTGTCTACGAGTACTGGTGGTAGGAGCCGGCCCTTCTGCGTTTGGCCTTGCTGCA 780
210 Y R C L R V L V V G A G P S A F G L A A 229
      NADPH-Bindungsstelle
781 CACCTTATCAACGTGACCTCTATGTTTCATACATAGTCATCTTTAGATGCTAACATTGAG 840
230 H L I N V T S M F I H S H H L D A N I Q 249

841 AAGCTTACGGAACACTATAAAAGGAAACAGACATAAAGCACTTCACACCAACGGGGGCT 900
250 K A Y G N Y K R K P D I K H F T P T G A 269
      „Lücke“
901 GTATTTGTGGACGATAGCACTGAAGAGTTCGATGTTGCTATACCTTTGCACAGGTTATAAA 960
270 V F V D D S T E E F D V A I L C T G Y K 289

961 TACAGCTTCCTTTCCTCAACTATGAGTCTTCTGGAGTGACGTGCTGAGAAAAATATATA 1020
290 Y S F P F L N Y E S S G V T S S E K Y I 309
      Primer 2 + 3
1021 ATGCCACTGTACAATCAACTTATTAACATTAATCACCCCAATGACCTTTGTGGGAACT 1080
310 M P L Y N Q L I N I N H P T M T F V G T 329
      Konservierte Region 322 – 328
1081 GGGAAATATTCTATTGGATTGGTTCGGGATAGGCAGGGTCACTACTCAGCACAAATTAGCG 1140
330 G K Y S I G L V R D R Q G H Y S A Q L A 349

1141 GCAGGGCTGGTTAAGCTACCGTCTAAAGATGAGATGTTTAAGGAGTGGTTCGATCACGCA 1200
350 A G L V K L P S K D E M F K E W F D H A 369

1201 AAACGCCAGACACCCAAAGAAATTAATCTAATTGGGTACGAAAATACGGCCAATTATATG 1260
370 K R Q T P K E I N L I G Y E N T A N Y M 389

1261 GACACTTTACTCAACGGAACAGATATTCCTCGTGTTCACATAGTGTTTACAACCACTTCTG 1320
390 D T L L N G T D I P R V P L V F T T I L 409

1321 CGAAACCACATAGATCTCTGGTACACGGAGTTTTTAACATTTTCGGAATTATCAAATAAAC 1380
410 R N H I D L W Y T E F L T F R N Y Q I N 429

1381 GTATTAAGTGATACGGAATATGAAATGATTGTCAAACCACAGAAGAACTTTGTCCATTT 1440
430 V L S D T E Y E M I V K P Q K K L C P F 449

1441 GATATATAAATCGTGTATTTATGATAGAGAATTTCCACATTTTATACAAAAATTTGTACC 1500
450 D I * 451
1501 TAATTTATTGACTTTATACAAAGTCAACATTACAGTCTATTTTATTTAAATTTGATTC 1560
1561 TATTCTAGCAGTGACAGATGACTAACAGATGTCAAAGTGCTTCCTTTCGTTTAAAAATT 1620
1621 TAGACTTAGAGCTCATGTTAAATTAATAAATAAAGTGTATCGTCTCCGAAAAAATAA 1679

```

Abbildung 9: cDNA- und Proteinsequenz der FMO von *Arctia villica*: N-terminale Signalsequenz von Aminosäure (AS) 1 – 18 (fett). FMO-typische Sequenz-Motive wie die FAD-Bindungsstelle von AS 35 – 40 und die NADPH-Bindungsstelle von AS 219 – 224 konnten auch bei AvFMO (Proteinsequenzen fett und kursiv) gefunden werden. Die SNO von *T. jacobaeae* (vgl. Abbildung 4 S. 56 und Abbildung 13 S. 74) verfügt über ein zusätzliches Sequenz-Motiv von 6 AS „(Lücke“ bei den *Arctia*-FMOs zwischen AS 252 und 253). Innerhalb der (vergleichenen) Insektensequenzen besteht eine konservierte Region von AS 322 – 328 (kursiv), die für die Konstruktion Primer 2 + 3 (unterstrichen) verwendet wurde.

### 3.3.5 PNO *Grammia geneura*

Die bereits gefundenen Flavin-abhängigen Monooxygenasen in der Gattung *Arctia* zeigen zueinander ein hohes Maß an Übereinstimmung (92,3 % Identität auf Proteinebene). Zu der einzig bekannten Senecionin *N*-Oxygenase von *T. jacobaeae*, deren Funktion durch Aktivitätsnachweise belegt war (Lindigkeit et al., 1997, Naumann et al., 2002), wiesen diese Sequenzen jedoch eine nur geringe Identität auf (für die FMOs von *A. caja* und *A. villica* jeweils 48 %). Da deshalb Zweifel darüber bestanden, ob es sich bei den gefundenen Sequenzen der beiden *Arctia*-Arten (Kap. 3.3.3 und 3.3.4) um zur SNO von *T. jacobaeae* orthologe Enzyme handelte, sollten weitere Arctiiden zur Identifizierung von PNOs untersucht werden (Kap. 3.3.1). Hierfür wurde der Generalist *Grammia geneura* ausgewählt, dessen Fähigkeit tertiäre Pyrrolizidinalkaloide zu *N*-Oxygenieren bereits gut dokumentiert war (Kap. 3.1.1, Hartmann et al., 2004c).

#### Primer 6

5'- GG(AGCT) GG(AGCT) ACI TGG( AC)G(AGCT) TA(CT) – 3'

Forwardprimer (256 x degeneriert) der gegen eine über die Art- und FMO-Grenzen der Arctiiden hinweg konservierte Region (AS 61 – 66 bei *T. jacobaeae*) gerichtet ist (vgl. Kap. 3.3.6, Abbildung 13). Bei der Konstruktion wurden in erster Linie die Sequenzen der Arctiiden zugrunde gelegt (AS 65 Arginin und AS 66 Tyrosin).

Abbildung 10: Degenerierter Forwardprimer, der gegen eine über die Artgrenzen hinweg konservierte, N-terminale Region gerichtet ist.

Da für die SNO von *T. jacobaeae* der Fettkörper als Hauptexpressionsort identifiziert werden konnte (Naumann, 2003) und die RNA der identifizierten FMO-Sequenzen von *A. caja* (Kap. 3.3.3) und *A. villica* (Kap. 3.3.4) auch aus dem Fettkörper isoliert werden konnte, wurde von *G. geneura* aus dem Fettkörper Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.6.2) und in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.6.3). Nach Vergleich der bislang bekannten Insekten-FMOs (3.3.1) und den bei *A. caja* und *A. villica* identifizierten FMOs (Kap. 3.3.3 und 3.3.4) wurde der degenerierte Primer 6 konstruiert (vgl. Abbildung 10), der mit Primer 3 (Abbildung 5, S. 57) eingesetzt wurde. Unter Verwendung dieser Primer konnte mit einem „Touchdown“- Programm bereits nach einer PCR ein spezifisches Amplifikat von etwas mehr als 800 bp erhalten und kloniert werden (Kap. 2.6.5).

#### TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION DES MITTELSTÜCKS DER PNO VON *G. GENEURA* MIT DEGENERIERTEN PRIMERN

+ 94°C	2 min	} 30 Zyklen, in denen die Annealingtemperatur um 0,5°C je Zyklus verringert wurde.
+ 94°C	45 sec	
+ 60°C - + 45°C	1 min	
+ 72°C	4 min	
+ 94°C	45 sec	} 5 Zyklen
+ 45°C	1 min	
+ 72°C	4 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	



Primer 18	1. Genspezifischer Primer (GSP1) zur cDNA-Synthese der 5'-RACE	
5'- CAA TTT CGA GGT GAC GTT AGA – 3'		$T_m = + 55,9^\circ\text{C}$
Primer 19	GSP2 der 5'-RACE	
5'- TAA TTC TTG TCC TTC GAT GTG AGG TAT TT – 3'		$T_m = + 61,0^\circ\text{C}$
Primer 20	GSP3 der 5'-RACE	
5'- TGA ATG TTG TCC ATC AAT TTA AAA TGT CTT A – 3'		$T_m = + 58,9^\circ\text{C}$
Primer 21	3'-RACE Primer	
5'- AGA CTT TCC TGG CAA CTA CAT AAG TAA – 3'		$T_m = + 60,4^\circ\text{C}$

Abbildung 11: RACE-Primer für die Identifizierung der cDNA der PNO von *G. geneura*

Nach Sequenzierung (Kap. 2.6.11) und Vergleich mit den bekannten Insekten-FMOs konnten bei diesem Amplifikat mit der Aminosäuresequenz -GAGPSG- (AS 218 – 223, Kap. 3.3.1, Abbildung 4 und Abbildung 12 S. 72) die Nukleotid-Bindungssequenz für das NADPH und gemeinsame, konservierte Sequenz-Motive identifiziert werden. Für die RACE-Techniken wurden nach den Sequenz-Informationen des Mittelstücks die erforderlichen Primer konstruiert (Abbildung 11). Mit nachfolgendem PCR-Programm konnte mit dem Primer 21 und Oligo(dT) (Kap. 2.4) ein ca. 950 bp großes Amplifikat vervielfältigt (Kap. 2.6.4.3) und kloniert werden (Kap. 2.6.5). Durch den überlappenden Bereich konnte diese Sequenz als fehlendes 3'-Ende identifiziert werden.

#### TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION DES 3'-ENDES DER PNO VON *G. GENEURA*

+ 94°C	3 min	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 60°C	1 min	
+ 72°C	10 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	

Die 5'-RACE erfolgte wie in Kap. 2.6.4.3 beschrieben mit den Primern 18 – 20 unter nachfolgendem Temperaturprogramm, mit dem ein spezifisches Amplifikat von ca. 480 bp amplifiziert werden konnte. Dieses konnte als fehlendes 5'-Ende identifiziert werden.

#### TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION DES 5'-ENDES DER PNO VON *G. GENEURA*

+ 94,0°C	3 min	} 35 Zyklen
+ 94,0°C	45 sec	
+ 57,1°C	1 min	
+ 72,0°C	3 min	
+ 72,0°C	10 min	
+ 15°C	∞	

Die gefundene Sequenz (Abbildung 12) weist eine Gesamtlänge von 1770 Basenpaaren auf, deren Leserahmen für ein Protein mit 459 Aminosäuren codiert. Nach Analyse mit ProtParam (Kap. 2.6.11) konnte eine Molekularmasse von 52,7 kDa bestimmt und ein Isoelektrischer Punkt (IEP) von 6,43 prognostiziert werden. Am 5'-Ende verfügt die cDNA über einen nicht codierenden Bereich von 78 bp. Der nicht codierende Bereich am 3'-Ende beträgt 312 bp. Neben der bereits beim

Mittelstück identifizierten NADPH-Bindungsstelle konnte auch das Sequenz-Motiv von AS 35 – 40 (-GSGYSG-) als Bindungsstelle für das FAD identifiziert werden (Abbildung 12).

Nach Analyse mit SignalP 3.0 (Kap. 2.6.11) konnte für die Sequenz von *G. geneura* eine potentielle N-terminale Signalsequenz bestimmt werden, deren Schnittstelle zwischen AS 23 und 24 liegt (Abbildung 12). Für das prozessierte Protein ergab die Analyse mit ProtParam (Kap. 2.6.11) eine Molekularmasse von 50,1 kDa und einen potentiellen IEP von 6,42. Die Vorhersage der subzellulären Distribution bzw. der Translokation durch die N-terminale Signalsequenz fällt wie bei der SNO von *T. jacobaeae* (Naumann, 2003) deutlich zugunsten eines sekretorischen Proteins aus (TargetP 1.1, Kap. 2.6.11). Weitere potentielle Signalsequenzen, die zu einer Adressierung für andere Kompartimente wie z. B. den Peroxisomen (z. B. durch die C-terminale Signalsequenz -Ser-Lys-Leu-) führen könnten, konnten nicht nachgewiesen werden (PSORT II, Kap. 2.6.11). Das Ergebnis lieferte auch keine Hinweise auf Retentions-Signalsequenzen wie die C-terminale Sequenz -Lys-Asp-Glu-Leu-, welche zu einem Verbleib des Proteins im endoplasmatischen Retikulum (ER) führt. Sequenzen, die auf ein membranständiges Protein hinweisen könnten, wie das N-terminale ER-Membran-Retentionssignal -Tyr-Arg-The-Cys- (PSORT II) oder Transmembran-Helices (TMHMM 2.0, Kap. 2.6.11) konnten nicht nachgewiesen werden.

Eine potentielle N-Glykosylierung konnte für Asparagin 53 prognostiziert werden (NetNGlyc 1.0). Weitere potentielle N-Glykosylierungen wurden an den Positionen 164 und 232 jedoch mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit vorhergesagt. Für eine posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung konnte eine grössere Anzahl von Aminosäuren bestimmt werden. So kommen 8 von den im Protein befindlichen Aminosäuren Serin, 6 von den AS Threonin und 13 von den AS Tyrosin für eine potentielle Phosphorylierung in Betracht (NetPhos 2.0). Eine Entfernung des Start-Methionins und nachfolgende N-Acetylierung der zweiten Aminosäure, wie sie für die humanen FMOs 1-3 angenommen werden (Cashman, 1995), konnte nicht vorhergesagt werden (NetAcet 1.0).

Vergleiche zwischen der SNO von *T. jacobaeae*, den FMO-Sequenzen der *Arctia*-Arten (Kap. 3.3.3 und 3.3.4) und der Sequenz von *G. geneura* (vgl. Abbildung 13, S. 74) auf AS-Ebene offenbarten ein höheres Maß an Übereinstimmung der Sequenz von *G. geneura* zur SNO von *T. jacobaeae* (Identität 75,0 %). Zwischen den Aminosäure-Sequenzen der *Arctia*-Arten und der SNO von *T. jacobaeae* bestehen mit 48,4 % für *A. caja* bzw. 48,1 % für *A. villica* deutlich geringere Sequenz-Übereinstimmungen. Zu den FMOs von *A. caja* und *A. villica* verfügt die gefundene Sequenz von *G. geneura* über eine Identität von 52,6 % bzw. 52,5 %. Das höhere Maß an Übereinstimmung zwischen der SNO von *T. jacobaeae* und der Sequenz von *G. geneura* äußerte sich in einer Vielzahl von Sequenz-Motiven, von denen das im Vergleich zu den identifizierten FMOs der *Arctia*-Arten zusätzliche Sequenz-Motiv von AS 251 – 256 bei *G. geneura* und von AS 248 – 253 bei *T. jacobaeae* auffiel (Abbildung 13). Dieses erschien besonders geeignet für die Konstruktion von degenerierten Primern, die über eine größere Spezifität für Pyrrolizidinalkloid N-Oxygenasen verfügen, so dass die Identifizierung weiterer PNOs vereinfacht werden konnte (Kap. 3.3.6, ff).

Die hohe Übereinstimmung der gefundenen FMO von *G. geneura* und der SNO von *T. jacobaeae* stützen die Vermutung, dass die eingangs in der Gattung *Arctia* gefundenen FMOs nicht den PNOs zuzurechnen sind. Sie entstammen potentiell paralogenen Genen, die durch die degenerierten Primer aufgefunden werden konnten (Kap. 3.3.3 und 3.3.4). Zusätzlich zu den vorliegenden molekularbiologischen Daten musste nun die Identifizierung der spezifischen Aktivität der FMO von *G. geneura* durch biochemische Expressionsanalysen durchgeführt werden. Zur Bestätigung

ob es sich bei der gefundenen FMO von *G. geneura* um eine PNO handelt, wird die cDNA der mutmaßlichen PNO von *G. geneura* heterolog im Expressionssystem *E. coli* exprimiert und auf Aktivitätgeprüft (Kap. 3.6).

```

1 CTACACTTACATTGAAGTGCAGTCTGTGCGCTCGCTTATAACGTTTTGATAGACCTCCAG 60
61 TAATATTCACTATATAAAATGTATCGGACGTGTGACCTAGTGATACTGTTGAGTTTGTTA 120
1 M Y R T C D L V I L L S L L 14

121 CATTTACTATCTTCACAAGTCTCGCTCAATCTGACCATGCGTCTCGAGCATGCATCATT 180
15 H L L S S Q V L A Q S D H A S R A C I I 34

181 GGTCTGTGGTTACTCAGGCTTGGCCGACGGAAGTACATGCAAGATTATGGCTCAACTAC 240
35 G S G Y S G L A A A K Y M Q D Y G L N Y 54
FAD-Bindungsstelle Primer 6

241 ACAGTATTCGAAGCTACACGTAACATTGGTGGCACCTGGAGATACGACCCTAGAGTGGGT 300
55 T V F E A T R N I G G T W R Y D P R V G 74

301 ACCGATGAAGATGGATTGCCCATATTTAGCAGCCAATATAAGTACCTTAGGACAAATTCT 360
75 T D E D G L P I F S S Q Y K Y L R T N S 94

361 CCATATAAGATAATGGAATCCACGACTATCCATTCCCAGAAGGCACTCGGTCGTTTATT 420
95 P Y K I M E F H D Y P F P E G T R S F I 114

421 ACTGGAGGTGCTTTTATAAGTATATGAAATCTTTCGTAAGACATTTTAAATTGATGGAC 480
115 T G G C F Y K Y M K S F V R H F K L M D 134

481 AACATTCAAGTTCAAAGTCTGTAACCTTGGGTAGAGTGGACGGGAGACAATTGAAAAGTA 540
135 N I Q V Q S L V T W V E W T G D N W K V 154

541 GCGTACATGAAGACTGACACCAGGAAAAATTATACGGAAGAATGTGATTTTGTGTCGTG 600
155 A Y M K T D T R K N Y T E E C D F V V V 174

601 GCAACCGGGGAATACAGTACACCTAAAATACCTCACATCGAAGGACAAGAATTATATACT 660
175 A T G E Y S T P K I P H I E G Q E L Y T 194

661 GAAAAACAATGCATAGTCACGATTATAAGGACCCTGAAGATTTTCGTGGCCAACGCGTG 720
195 G K T M H S H D Y K D P E D F R G Q R V 214

721 ATGCTGATAGGAGCTGGTCCATCAGGACTCGATCTCGCCGTGACGTTTCTAACGTCACC 780
215 M L I G A G P S G L D L A V Q L S N V T 234
NADPH-Bindungsstelle

781 TCGAAATTTGGTGACAGTCATCATATTATTAAGTCTTTCAAAATCTACAATCAGCCAGAC 840
235 S K L V H S H H I I K S F K I Y N Q P D 254
PNO-Sequenz-Motiv

841 TTTCTGGCAACTACATAAGTAAACCAATGTGAAATATTTCACTTCGACTGGAGCTGTG 900
255 F P G N Y I S K P N V K Y F T S T G A V 274

901 TTCGAGGACGGCACTACTGAAGACTTCGATATCGTTATATATTGTACAGGTTTCTACTAT 960
275 F E D G T T E D F D I V I Y C T G F Y Y 294

961 AACCACCCGTTCTGAGCACTCAATCCAGTGGTGTAAACAACGACAGAGAAGTACGTGATG 1020
295 N H P F L S T Q S S G V T T T E N Y V M 314
Primer 3

1021 CCTCTATACCAAGCGTTGTAAACATTAATCAGCCCACTATGACATTCGTAGGAATTGTC 1080
315 P L Y Q A V V N I N Q P T M T F V G I C 334
Konservierte Region AS 326-332

1081 AAGCCGTTTTACGCTAAAATTCTGGATATCCAGGCTCAATATTCAGCAGCGCTAGCAGCA 1140
335 K P F Y A K I L D I Q A Q Y S A A L A A 354

1141 AAAAAGTTTGAATTGCCGTCCAAAGATTCAATGTTACGTATTGGCTAGAGCATGTATAT 1200
355 K K F E L P S K D S M L R H W L E H V Y 374

1201 GCGCTGAGACAGTCACAGTTCAAAGTTTCAAATATCAATGCTATTGGGTCAAATATAGAC 1260
375 A L R Q S Q F K V S N I N A I G S N I D 394

1261 CAATATTTTGGAGCTCTACACAAAGAAGCACATGTACCTTTAGTGCCACCAGTGACACA 1320
395 Q Y F E A L H K E A H V P L V P P V Y T 414

1321 TCAATGTTACGTTACGCGGGAAGACCTTATTAGAAGACCTACTCAATTATCGTGAATAT 1380
415 S M F T F S G K T L L E D L L N Y R E Y 434

1381 GACTATCGCATCATTAGTGACACGCAATTTACAAAGAAGTTCAATCCAAGGAAGGAAATA 1440
435 D Y R I I S D T Q F T K K F N P R K E I 454

1441 TGTCTTTTACGATTAGCAAAAACCTAAATGTGATTTTGATTAGTATATTTTAGTACAC 1500
455 C P F D D * 459

1501 TCTCCTGTGATTCCCGAGTAGAAAAGAGCCTGTACTATATCAACTAGACTGTTGATAAACA 1560
1561 AATTTATTTACTAATCAGTAATTACAAATGTACCTACTGTGTACATGTTGATGTACG 1620
1621 AAAATCAGAACAAATAGTTGTGTACAGTATCGACTACCCATGGCTATCAATAAAGATT 1680
1681 GACAATCACTAAACCAATGGTGGTCAATGTCCTCATAAATTTTTGTTTTACATATTTTG 1740
1741 TTTATTACATACATATATTATTGAAAAA 1770

```

Abbildung 12: cDNA- und Proteinsequenz der PNO von *G. geneura*: N-terminale Signalsequenz von Aminosäure (AS) 1 -23 (fett). Die Sequenz verfügt über FMO-typische Sequenz-Motive wie die FAD-Bindungsstelle von AS 35 – 40 und die NADPH-Bindungsstelle von AS 218 – 223 (Proteinsequenzen fett und kursiv). In Übereinstimmung mit der SNO von *T. jacobaeae* weist die potentielle PNO von *G. geneura* im Vergleich zu den FMOs der *Arctia*-Arten eine zusätzliche Sequenz von 6 AS auf (AS 250 – 256, fett und kursiv).

### 3.3.6 Konstruktion der zweiten Generation degenerierter Primer

Durch die Identifizierung jeweils einer Flavin-abhängigen Monooxygenase bei *A. caja*, *A. villica* und *G. geneura* (Kap. 3.3.3 ff.) standen nun neben der SNO von *T. jacobaeae* Sequenz-Informationen für drei weitere FMOs der Arctiiden zur Verfügung. Von den identifizierten Sequenzen wies die Sequenz von *G. geneura* die höchste Übereinstimmung zur SNO von *T. jacobaeae* auf (Kap. 3.3.5). Im Vergleich hierzu unterschieden sich die bei den *Arctia*-Arten identifizierten Sequenzen stärker von der SNO von *T. jacobaeae* und der potentiellen PNO von *G. geneura* (Kap. 3.3.3, Kap. 3.3.4 und Kap. 3.3.5). Dies ließ den Schluss zu, dass die Sequenz von *G. geneura* besser geeignet war degenerierte Primer für die Identifizierung von PNOs zu konstruieren. Zur Konstruktion neuer, auf die nun vorliegenden Arctiidensequenzen besser abgestimmter, degenerierter Primer wurden die bekannten Insekten-FMOs in einem weiteren Alignment miteinander verglichen (Abbildung 13).

Um den Grad der Degeneriertheit der Primer zu verringern (Kap. 2.4 und 3.3.1), wurden Primer für ein potentiell PNO-spezifisches Sequenz-Motiv konstruiert, bei dem die Sequenzen von *G. geneura* und *T. jacobaeae* zueinander eine hohe Übereinstimmung aufwiesen und sich aber von den beiden Sequenzen der *Arctia*-Arten deutlich unterschieden. Für die Konstruktion der Primer 7 und 8 wurde das AS-Motiv - (Y/F)NQPDFP - (AS 247 – 253, *T. jacobaeae*, Abbildung 13 und 14) als Matrize verwendet. Die bisher bekannten Flavin-abhängigen Monooxygenasen der beiden *Arctia*-Arten verfügen an dieser Stelle über eine Lücke von 6 Aminosäuren. In Analogie zu Primer 7 und 8 wurde ein potentiell FMO-spezifisches Sequenz-Motiv (AS 257 – 263, *A. caja*), welches auf den Sequenz-Informationen der FMOs von *A. caja* und *A. villica* basierte, für die Konstruktion von Primer 9 verwendet. Als Ergänzung zu Primer 9 wurde Primer 10 gegen ein potentiell FMO-spezifisches Sequenz-Motiv konstruiert (AS 237 – 242, *A. caja*, Abbildung 13 und 14).

Nach den bestehenden Sequenz-Informationen der Arctiiden-FMOs (Kap. 3.3.3 ff.) konnte erwartet werden, dass bei den bereits untersuchten *Arctia*-Arten mindestens noch eine weitere FMO, die mutmaßliche PNO, vorliegen musste. Zur Identifizierung der PNO wurden *A. caja* und *A. villica* noch einmal mit den degenerierten Primern 7 bzw. 8 (Abbildung 14) untersucht (Kap. 3.3.7 bzw. 3.3.8). Um weitere Informationen über mögliche FMOs innerhalb der Arctiiden und deren Verwandtschaftsbeziehungen zueinander zu erhalten, wurde *T. jacobaeae* mit den Primern 9 bzw. 10 (Abbildung 14) auf weitere FMO-Sequenzen untersucht (Kap. 3.3.10).

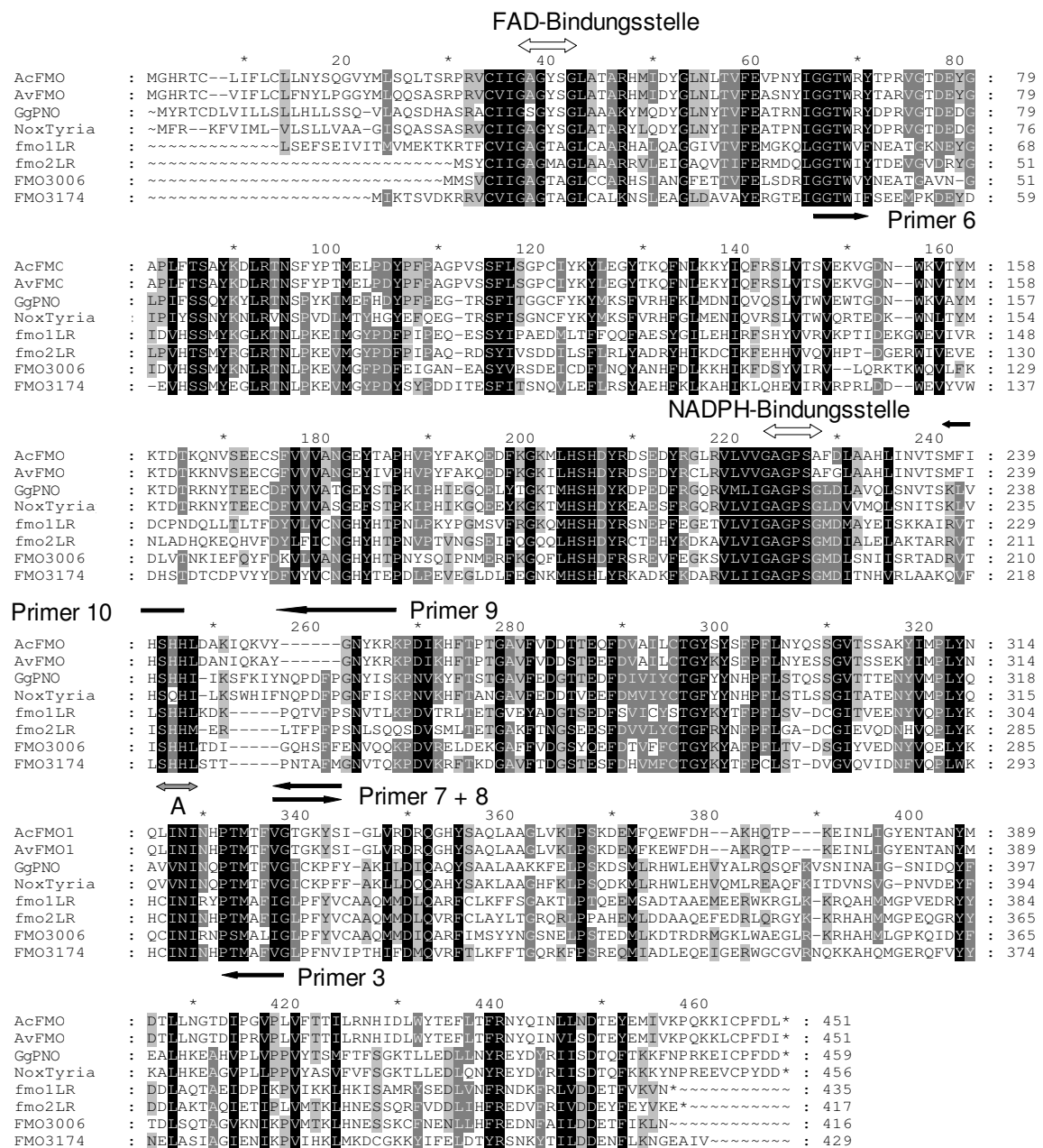


Abbildung 13: 2. Alignment zur Konstruktion von degenerierten Primern. Vergleich der bekannten Flavin-abhängigen Monooxygenasen aus Insekten mit den identifizierten FMOs der Arctiiden.

Sequenzbezeichnungen:

AcFMO: FMO von *A. caja*. AvFMO: FMO von *A. villica*. GgPNO: Potentielle PNO von *G. geneura*.  
NoxTyria: Senecionin N-Oxygenase (SNO) von *T. jacobaeae*. FMO3006 + 3174: FMOs von *D. melanogaster*. fmo1 + 2: FMOs von *A. gambiae*.

Schwarze Pfeile kennzeichnen die Lage von Primern. Zum C-Terminus weisende Pfeile kennzeichnen Forward-Primer und zum N-Terminus weisende Pfeile kennzeichnen Reverse-Primer. Die Primer 6, 7 und 8 sind unterhalb und die Primer 9 und 10 oberhalb der dazugehörigen AS-Sequenz eingezeichnet. Weiße Doppelpfeile oberhalb der dazugehörigen AS-Sequenz kennzeichnen die FAD-Bindungsstelle (AS 32 – 37 bei *T. jacobaeae*) bzw. die NADPH-Bindungsstelle (AS 215 – 220 bei *T. jacobaeae*). Primer 6: Forward-Primer, der gegen ein über die Artgrenzen hinweg konserviertes FMO-Sequenz-Motiv gerichtet ist. Primer 7 + 8: Diese Primer sind gegen ein potentiell PNO-spezifisches Sequenz-Motiv gerichtet. Primer 9: Reverse-Primer der in Analogie zu Primer 7 und 8 zur Amplifizierung von Arctiiden-FMOs konstruiert wurde. Primer 10: Die Konstruktion erfolgte in Übereinstimmung mit den FMO-Sequenzen der Gattung *Arctia* zur Amplifizierung von Arctiiden-FMOs. Der graue Doppelpfeil (A) kennzeichnet einen konservierten Sequenz-Abschnitt, der mutmasslich die Cosubstratspezifität beeinflusst (vgl. Suh, 1999b).

## Primer 7

5'- T(AT)(CT) AA(CT) CA(AG) CC(AGCT) GA(CT) TT(CT) CC – 3'

Forward-Primer (256 x degeneriert) der gegen die potentiell PNO-spezifische Aminosäuresequenz - (Y/F)NQPDFP - (AS 247 – 253 *T. jacobaeae*) gerichtet ist. Er wurde konstruiert, um die Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt der cDNA von noch nicht identifizierten Pyrrolizidinalkloid *N*-Oxygenasen zu erhöhen.

## Primer 8

5'- GG(AG) AA(AG) TC(AGCT) GG(CT) TG(AG) TT(AG) (AT)A – 3'

Reverse-Primer (256 x degeneriert) der wie Primer 7 gegen die potentiell PNO-spezifische Aminosäuresequenz 247 - 253 gerichtet ist. Er wurde konstruiert, um die Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt der cDNA von noch nicht identifizierten Pyrrolizidinalkloid *N*-Oxygenasen zu erhöhen. Aufgrund der Lage ein in der (Semi)-Nested PCR universell einsetzbarer Primer.

## Primer 9

5'- TT(AGCT) (CT)(GT)(CT) TT(AG) TA(AG) TTI CC(AG) TA – 3'

Reverse-Primer (256 x degeneriert). Gerichtet ist dieser Primer gegen die Region, die die PNOs und FMOs unterscheidet (vergleiche auch Primer 7 + 8). Dieser Primer liegt bei den FMOs im Bereich von AS 252 - 258 (bezogen auf die FMO von *A. caja*) und somit also über der „Lücke“, die die FMOs im Vergleich zu den potentiellen PNOs hat. Bei Primer 9 wurde das Sequenz-Motiv – YGNYK RK – berücksichtigt.

I : Unspezifisch Bindende Base Inosin setzt den Grad der Degeneriertheit herunter.

## Primer 10

5' - TG(AG) TG(AGCT) (GC)(AT)(AG) TG(AGT) AT(AG) AAC AT – 5'

Reverse-Primer (384 x degeneriert). Gerichtet ist dieser Primer gegen eine Region, die zum Teil bei den bekannten Insekten-FMOs hoch-konserviert ist und zum anderen Teil durch die Ausrichtung auf die FMOs der *Arctia*-Arten einen geringeren Grad der Degerierung aufweist. Dieser Primer liegt bei den FMOs im Bereich von AS 237 -243 (- MFIHSHH -, nach FMO von *Arctia caja*) somit also in einer Region, die mutmaßlich spezifisch für die FMOs innerhalb der Arctiiden ist.

Abbildung 14: 2. Generation degenerierter Primer nach Vorlage des 2. Alignments

### 3.3.7 PNO *Arctia caja*

Mit den erworbenen Sequenz-Informationen der FMOs der beiden *Arctia*-Arten (Kap. 3.3.3, Kap. 3.3.4) und der potentiellen PNO von *G. geneura* (Kap. 3.3.5) konnten nach Vergleich mit den anderen Insekten-FMOs (Kap. 3.3.1) weitere Sequenz-Motive als konserviert und auch als spezifischer für die FMOs bzw. die potentiellen PNOs der Arctiiden erkannt werden. Diese Regionen dienten bei der Konstruktion von neuen, degenerierten Primern als Matrize (Kap. 3.3.6). Für die gezielte Amplifizierung der PNO aus *Arctia caja* bot sich hierfür besonders der gegen die mutmaßlich spezifische PNO-Sequenz gerichtete Primer 8 an (Abbildung 14, S. 75).

Da durch Aktivitätsmessungen der Hämolymphe von *E. albicosta* (Kap. 3.1.2) Hinweise vorlagen, dass die PNO bei einigen Arctiiden induzierbar sein könnte, wurden die Raupen vor der Isolierung von Gesamt-RNA mit einer Mischkost aus Löwenzahn und einem pyrrolizidinalkaloidhaltigem Kunstfutter (2.5.1.1) aufgezogen. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Ansätzen (Kap. 3.3.3 ff.) wurde aus dem Fettkörper von *A. caja* Gesamt-RNA wie in Kap. 2.6.2 beschrieben isoliert und in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.6.3). Um die Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt zu erhöhen, wurde erneut das zweistufige PCR-Verfahren der Semi-Nested-PCR verwendet (Kap. 2.6.4.2). Im ersten Vervielfältigungsschritt erfolgte die PCR mit den Primern 1 (Kap. 3.3.1) und 8. Der PCR-Ansatz wurde mit 10 mM Tris-Puffer 1:100 verdünnt und direkt im zweiten Schritt der Semi-Nested-PCR mit den Primern 6 (Abbildung 10, S. 68) und 8 eingesetzt. Mit den folgenden Temperaturprogrammen konnte in der zweiten Stufe der Semi-Nested-PCR erfolgreich ein ungefähr 600 bp großes Amplifikat vervielfältigt werden. Nach Klonierung (Kap. 2.6.5) und Sequenzierung (Kap. 2.6.11) konnte eine Teilsequenz identifiziert werden, die neben einer NADPH-Bindungsstelle eine hohe Übereinstimmung mit der SNO von *T. jacobaeae* aufwies.

#### TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION EINES INTERNEN FRAGMENTS DER PNO VON *A. CAJA* ERSTE STUFE DER SEMI-NESTED-PCR

+ 94°C	<u>2 min</u>	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 54,0 °C	1 min	
+ 72°C	<u>3 min</u>	
+ 72°C	<u>10 min</u>	
+ 15°C	∞	

#### TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION EINES INTERNEN FRAGMENTS DER PNO VON *A. CAJA* ZWEITE STUFE DER SEMI-NESTED-PCR

+ 94°C	<u>3 min</u>	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 58,2°C	1 min	
+ 72°C	<u>4 min</u>	
+ 72°C	<u>10 min</u>	
+ 15°C	∞	



Primer 22	1. Genspezifischer Primer (GSP1) für cDNA Synthese	
5' - CAC TAA TTT CGA GGT GAC GTT AGA AA - 3'		$T_m = + 60,1^\circ\text{C}$
Primer 23	GSP2 der 5'-RACE	
5' - TGT ATC CCG TCC ATT CAA CCC AAT T - 3'		$T_m = + 61,3^\circ\text{C}$
Primer 24	GSP3 der 5'-RACE	
5' - GCT GAT AAA CGA ACG AGT ACC ATT T - 3'		$T_m = + 59,7^\circ\text{C}$
Primer 25	3'-RACE-Primer	
5' - CTC ACA TCA AAG GAC AAG AGT TAT A - 3'		$T_m = + 58,1^\circ\text{C}$
Abbildung 15: RACE-Primer für die Identifizierung der cDNA der potentiellen PNO von <i>A. caja</i>		

Für die Vervollständigung des gefundenen cDNA-Sequenzfragments wurden spezifische Primer für die RACE-Techniken konstruiert (Abbildung 15). Für die Amplifikation des 3'-Endes der gefundenen cDNA wurden Primer 25 und der Oligo(dT)-Primer (Kap. 2.4) eingesetzt. Die Vervielfältigung eines ca. 1300 bp großen PCR-Produktes gelang durch nachfolgendes Temperaturprogramm:

TEMPERATURPROGRAMM FÜR DIE AMPLIFIKATION DES 3'-ENDES DER POTENTIELLEN PNO VON *A. caja*

+ 94°C	2 min	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 62,6°C	1 min	
+ 72°C	3 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	

Das erhaltene PCR-Produkt wurde kloniert (Kap. 2.6.5) und sequenziert (Kap. 2.6.11). Nach Auswertung mit der GCG-Software (Kap. 2.6.11) konnte die gefundene Teilsequenz als 3'-Ende der cDNA identifiziert werden. Für die Isolierung des 5' Endes der Sequenz erfolgte die cDNA Synthese wie in Kap. 2.6.3 beschrieben mit Primer 22 (Abbildung 15). Die beiden aufeinander folgenden Stufen der 5'-RACE erfolgten (Kap. 2.6.4.3) mit den Primern 23 bzw. 24 (Abbildung 15) unter Verwendung der folgenden Temperaturprogramme:

TEMPERATURPROGRAMM FÜR DIE AMPLIFIKATION DES 5'-ENDES DER POTENTIELLEN PNO VON *A. caja* MIT DEM 2. GENSPEZIFISCHEN PRIMER (PRIMER 23)

+ 94°C	2 min	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 61,8°C	1 min	
+ 72°C	4 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	

### TEMPERATURPROGRAMM FÜR DIE AMPLIFIKATION DES 5'-ENDES DER POTENTIELLEN PNO VON *A. caja* MIT DEM 3. GENSPEZIFISCHEN PRIMER (PRIMER 24)

+ 94°C	2 min	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 55,4°C	1 min	
+ 72°C	4 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	

Eine spezifische Bande von ca. 420 bp wurde kloniert (Kap. 2.6.5) und nach Sequenzierung als fehlendes 5'-Ende identifiziert. Der offene Leserahmen der vollständigen cDNA codiert für ein Protein mit 459 Aminosäuren. Der nicht codierende Bereich beträgt am 5'-Ende 63 bp und am 3'-Ende 495 bp (Abbildung 16). In Übereinstimmung mit der bei *G. geneura* identifizierten PNO (Kap. 3.3.5 und 3.6.2) konnte für die hier gefundene Sequenz von *A. caja* eine N-terminale Signalsequenz vorhergesagt werden (Kap. 2.6.11, SignalP), die eine Schnittstelle zwischen Aminosäure (AS) 23 und 24 aufweist. Für das unprozessierte Protein konnte mit der Software ProtParam (Kap. 2.6.11) ein Molekulargewicht von 52,4 kDa und ein Isoelektrischer Punkt von 6,78 berechnet werden. Nach Entfernung der Signalsequenz wurde für das 436 AS lange Protein eine Molekularmasse von 49,8 kDa und ein IEP von 6,48 berechnet (ProtParam).

Durch Vergleich mit den schon zuvor isolierten Arctiidensequenzen konnten neben der FAD-Bindungsstelle von AS 35 - 40 und der NADPH-Bindungsstelle von AS 218 - 223 weitere konservierte Sequenz-Abschnitte identifiziert werden (Abbildung 16). So konnte bei dieser zweiten FMO von *Arctia caja* das Sequenz-Motiv das für Primer 3 verwendet wurde (AS 326 – 330, Abbildung 13 S. 74) ebenso wiedergefunden werden wie das bei den beiden PNOs gefundene Sequenz-Motiv von AS 250 – 256, welches für die Konstruktion von Primer 8 als Matrize diente (Abbildung 13 S. 74).

Diese zweite FMO von *A. caja* weist nach Prognose mit SignalP eine N-terminale Signalsequenz auf, die diese FMO potentiell über den vesikulären Transport zur Sekretion bringt. Die Vorhersage der subzellulären Distribution bzw. der Translokation durch die N-terminale Signalsequenz fällt wie bei der SNO von *T. jacobaeae* (Naumann, 2003) im Gegensatz zu den Sequenzen der *Arctia*-Arten deutlich zugunsten eines sekretorischen Proteins aus (TargetP 1.1, Kap. 2.6.11). Weitere potentielle Signalsequenzen, die zu einer Adressierung für andere Kompartimente wie z. B. dem endoplasmatischen Reticulum führen könnten, konnten nicht nachgewiesen werden (PSORT II, Kap. 2.6.11).

Als potentielle Träger von posttranslationalen Modifikationen konnten auch bei dieser Sequenz eine Reihe von Aminosäuren bestimmt werden. Durch Analyse mit NetNGlyc 1.0 (Kap. 2.6.11) konnten potentielle N-Glykosylierungen für die Positionen 108, 153, 164, 232 und 449 prognostiziert werden. O-Glykosylierung konnten für dieses Protein jedoch nicht vorhergesagt werden (NetOGlyc 3.1). Nach Analyse mit NetPhos 2.0 konnte eine Vielzahl von potentiell phosphorylierten Aminosäuren prognostiziert werden, von denen die Aminosäuren Serin 94, 280, Threonin 181, 279 und Tyrosin 203 die höchste Bewertung erhielten.

Nach Vergleich der zweiten FMO-Sequenz von *A. caja* und der SNO von *T. jacobaeae* (GCG-Software, Kap. 2.6.11) zeigte sich eine Identität von 76,3 % auf Proteinebene. Im Vergleich hierzu

besteht zwischen der zuerst identifizierten FMO von *A. caja* (Kap. 3.3.3) und der SNO von *T. jacobaeae* nur eine Identität von 48,4 %. Die beiden FMO-Sequenzen von *A. caja* (Kap. 3.3.3) wiesen zueinander eine Identität von 51,9 % auf. Zu der bei *G. geneura* identifizierten potentiellen PNO (Kap. 3.3.5) konnte eine Identität von 85,7 % bestimmt werden. Von den bislang identifizierten FMO-Sequenzen der Arctiiden (Naumann, 2002, Kap. 3.3.3 ff.) zeigte die zweite Sequenz von *A. caja* die größte Übereinstimmung mit der SNO von *T. jacobaeae* (Naumann, 2002) bzw. mit der PNO von *G. geneura* (Kap. 3.3.5), für die die *N*-Oxygenierung von tertiären PAs nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.6.2). Die cDNA der zweiten FMO-Sequenz von *A. caja* wurde heterolog im Expressionssystem *E. coli* zur Expression gebracht und das rekombinante Protein auf Aktivität geprüft (Kap. 3.6.1.2).

```

1  GTGCGATCCGGGCGCTCGGTTATAACGTTTGTCTACCACTACCTAATTCACAACAT  60
61 AAAATGTATCGGACATGTAGGCTATTTATAGTGTGAGTTTATTACACTTACTTACTTCA  120
1  M Y R T C R L F I V L S L L H L L T S 19

121 CAAGTGCTCGCTCAATCTAGCCCAACGTCTCGAGTATGCATCATTGGTTCCGGTCACTCA  180
20 Q V L A Q S S P T S R V C I I G S G H S 39
                                     FAD-Bindungsstelle
181 GGCTTGGCCGAGCGAGGCATATGCAAGACTATGGCCTTAGCTATACAGTATTCGAAGCT  240
40 G L A A A R H M Q D Y G L S Y T V F E A 59
      Primer 6
241 ACACGTAACATTGGTGGCACCTGGAGATACGATCCTAGAGTGGGTACTGATGAAGATGGA  300
60 T R N I G G T W R Y D P R V G T D E D G 79

301 TTACCTATATTTAGCAGCCAATATAAAACCTAAGGACAAATTCTCCATATAAGATAATG  360
80 L P I F S S Q Y K N L R T N S P Y K I M 99

361 GAATTCACGACTATTTCATCCCAAATGGTACTCGTTCGTTTATCAGCGGAGGTTGTTTC  420
100 E F H D Y S F P N G T R S F I S G G C F 119

421 TATAAGTATATTAATCTTTTCGTTAGACATTTTGGATTGATGGACAATATTCAGGTGCAA  480
120 Y K Y I K S F V R H F G L M D N I Q V Q 139

481 AGTCTGGTAAATTGGGTTGAATGGACGGGATACAGTTGGAACCTAACGTATATGAAGACC  540
140 S L V N W V E W T G Y S W N L T Y M K T 159

541 GACACCCGGCAAAATTATACAGAAGAATGTAGTTTGTGTGCTGGCAACCGGGAATAC  600
160 D T R Q N Y T E E C S F V V V A T G E Y 179

601 AGTACACCCAAAATACCTCACATCAAAGGACAAGAGTTATATAAAGGAAAAACATGCAT  660
180 S T P K I P H I K G Q E L Y K G K T M H 199

661 AGTCACGATTATAAGGACCCCTGAAGATTTTCGTGGCCAACGTGTGATGCTGATAGGAGCT  720
200 S H D Y K D P E D F R G Q R V M L I G A 219
                                     NADPH -
721 GGTCCATCAGGGCTCGATCTTGCCGTGCAGCTTTCTAACGTCACCTCGAAATTAGTGAC  780
220 G P S G L D L A V Q L S N V T S K L V H 239
      Bindungsstelle      Primer 8
781 AGTCAACATATTATTAAGTCTTTCAAATATACAATCAGCCAGATTTTCCTGGGAACACT  840
240 S Q H I I K S F K I Y N Q P D F P G N Y 259
                                     PNO-Sequenz-Motiv
841 ATAAGTAAACCAATGTGAAATATTTCACTCCGAATGGAGCTGTGTTCAAGATGACACT  900
260 I S K P N V K Y F T P N G A V F E D D T 279

901 TCTGAGGAATTCGATATCATCATATATTGTACAGGTTTCTACTACAACCATCCGTTTCTG  960
280 S E E F D I I I Y C T G F Y Y N H P F L 299

961 AGCACTCAATCCAGCGGTGTAACAACGACAGAGAACTACGTGATGCCTTTTATATCAAGCG  1020
300 S T Q S S G V T T T E N Y V M P L Y Q A 319

1021 GTTGTAACATCAATCAGCCCACTATGACATTTATAGGAATTTGCAAGCCGTTTTCGCT  1080
320 V V N I N Q P T M T F I G I C K P Y F A 339
      Konservierte Region von AS 326 - 332
1081 AAAATTCTGGATCTCCAGGCTCAATATTACGACGCTTAGCGGCAGGCCAGTTTCAGTTG  1140
340 K I L D L Q A Q Y S A A L A A G Q F Q L 359

1141 CCTACCAAAGATTTCGATGTTACGCCACTGGCTAGAGCATGTACATATGCTGAAAGAGTCA  1200
360 P T K D S M L R H W L E H V H M L K E S 379

1201 CAATTCAAAATAACAGATGTCAACAGTGTGGCATAAATATAGATAAATATTCTGAAGCT  1260
380 Q F K I T D V N S V G I N I D K Y S E A 399

1261 CTACACAAAGAAGCGGGCGTACCTCTATTACCACCAAGTGTATACATCAATGTTACGTTTC  1320
400 L H K E A G V P L L P P V Y T S M F T F 419

1321 AGCGGGAAGACCTTGCTAGAAGACCTACTCCATTACCGAGATTATGACTATCACATCATT  1380
420 S G K T L L E D L L H Y R D Y D Y H I I 439

1381 AGTAACACCAATTCAAAAAGAATCTCAATCCAAGTAAAGAAATATGTCCTTTTGACGAC  1440
440 S N T Q F K K N L N P S K E I C P F D D 459

1441 TAGGATTAAATGTGATATTGTTTAATACATCTTAATCCCGCCACGTGATTCCTAAGTA  1500
460 *
1501 GGCAGAGCCTGTACTATAGTACCTGACCTTTTGTGACTAATTAGTAATTACAAATGTA  1560
1561 CTATGTGCATATTATTATGTACAAAAATAATACCAGAAGCAGAACAAATGATTACTATGG  1620
1621 CATAGTTACATTGCTAACCCTAAACCAATATTAAAGTTTATCAAAAGGTTTCGATTTCTG  1680
1681 CTCAGTCCTAGTGTATGTATAAATGAACACATTGCGCTGAGAGTTTCTACATAAGTTTGT  1740
1741 GCACATATACAAAAAGGTCACCTACGTGTTCTAGGTCTGTGTAAATGTACAAACAGTG  1800
1801 AAGCAATTATTGTTTGCCATCACAAATTGCTACACTGTTTCGTTACCTTTGACCTGACTAC  1860
1861 TTACTACTTTGTATTAACATATTTTGTGATGAAGTAGTGGCTATATTAGAAATAAGAAA  1920
1921 TATTTATATAAAAAAAA 1938

```

Abbildung 16: cDNA und Proteinsequenz der potentiellen PNO von *Arctia caja*: N-terminale Signalsequenz von Aminosäure (AS) 1 – 23 (fett). Die Sequenz verfügt über eine FAD-Bindungsstelle von AS 35 – 40 und über eine NADPH-Bindungsstelle von AS 218 – 223 (fett und kursiv). Die Bindungsstellen der eingesetzten degenerierten Primer 6 und 8 sind unterstrichen. Von AS 250 – 256 weist die Sequenz von *A. caja* die mutmaßlich PNO-spezifische Sequenz auf (fett und kursiv) .

### 3.3.8 PNO *Arctia villica*

Die Identifizierung von zwei unterschiedlichen Flavin-abhängigen Monooxygenasen bei *Arctia caja* (Kap. 3.3.3 und 3.3.5), von denen die als erste identifizierte FMO (Kap. 3.3.3) eine vergleichbar geringe Identität zur SNO von *T. jacobaeae* aufwies wie die FMO von *A. villica* (Kap. 3.3.4), legte die Vermutung nahe, dass die zuerst gefundene FMO von *A. villica* nicht die ursprünglich gesuchte PNO sein konnte. Deshalb wurde zur Identifizierung der potentiellen PNO *A. villica* noch einmal untersucht. Da erste Hinweise für eine mögliche Induzierbarkeit der Expression der potentiellen PNO vorlagen, wurden für die Gewebeisolierung und nachfolgenden RNA-Präparation Raupen ausgewählt, die für 48 h mit *Senecio jacobaeae* gefüttert worden waren. Wie bereits bei der Identifizierung der SNO von *T. jacobaeae* (Naumann et al., 2002) und der PNO von *G. geneura* (Kap. 3.3.5 und 3.6.2) wurde Gesamt-RNA aus dem Fettkörper isoliert (Kap. 2.6.2) und in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.6.3). Um die Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt zu erhöhen, wurde erneut das zweistufige Semi-Nested-Verfahren eingesetzt.

Primer 26	1. Genspezifischer Primer [GSP 1] für die cDNA-Synthese	
5' - ACA AAA TCA CAT TCT TCC GTA TAA - 3'		$T_m = + 54,2^{\circ}\text{C}$
Primer 27	GSP2 der 5'-RACE	
5' - GGT TCC AAC TGT CTC CCG TCC ATT CT - 3'		$T_m = + 66,4^{\circ}\text{C}$
Primer 28	GSP3 der 5'-RACE	
5' - GAA AGA TTT AAT ATA CTT ATA GAA GCA ATC - 3'		$T_m = + 57,6^{\circ}\text{C}$
Primer 29	3'-RACE-Primer	
5' - ATA CCT CAC ATC AAA GGA CAA GAG TTA - 3'		$T_m = + 60,4^{\circ}\text{C}$
Abbildung 17: RACE-Primer für die Identifizierung der cDNA der potentiellen PNO von <i>Arctia villica</i>		

Zur Amplifikation der gesuchten cDNA wurde für die erste Vervielfältigung Primer 6 (Abbildung 10, S. 68) und der Oligo(dT)-Primer (Kap. 2.4) in einem „Touchdown“-Programm (s. u.) eingesetzt. Das so erhaltene Gemisch von PCR-Produkten wurde 1:100 verdünnt und direkt für die zweite PCR-Stufe verwendet. Unter Verwendung desselben Temperaturprogramms konnte mit Primern 6 und 8 (Abbildung 10, S. 68 bzw. Abbildung 14, S. 75) erfolgreich eine ca. 600 bp große Bande amplifiziert werden. Diese wurde kloniert (Kap. 2.6.5) und sequenziert (Kap. 2.6.11).

TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION EINES INTERNEN FRAGMENTES DER PNO VON *A. VILICA* MIT DEGENERIERTEN PRIMERN

+ 94°C	2 min	} 30 Zyklen, in denen die Annealingtemperatur um 0,5°C je Zyklus verringert wurde.
+ 94°C	45 sec	
+ 60°C - + 45°C	1 min	
+ 72°C	3 min	
+ 94°C	45 sec	} 5 Zyklen
+ 45°C	1 min	
+ 72°C	3 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	

Nach Auswertung mit der GCG-Software und Vergleich mit den bislang identifizierten Flavin-abhängigen Monooxygenasen konnten konservierte Sequenz-Motive wie die NADPH-Bindungsstelle (-GAGPSG-) identifiziert werden (2.6.11). Der gefundene Sequenz-Abschnitt wurde deshalb als Matrize für die Konstruktion von RACE-Primern verwendet (Abbildung 17). Mit den Primern 26 – 28 konnte unter Verwendung des nachfolgend aufgeführten Temperaturprogramms mit der 5'-RACE (Kap. 2.6.4.3) ein ca. 460 bp großes, spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden, welches nach Vergleich als fehlendes 5'-Ende identifiziert werden konnte.

#### TEMPERATURPROGRAMM FÜR DIE AMPLIFIKATION DES 5'-ENDES DER PNO VON *A. VILICA*

+ 94°C	2 min	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 58,8°C	1 min	
+ 72°C	4 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	

Die Amplifizierung des 3'-Endes mit der 3'-RACE (Kap. 2.6.4.3) gestaltete sich unerwartet schwierig. Hierfür zeigt sich vermutlich eine nach längerer Lagerung der Raupen bei – 80°C schlechte RNA-Qualität verantwortlich. Da neue Raupen bislang nicht verfügbar waren, konnte die Sequenz nicht vervollständigt werden.

Die hier isolierte Teil-Sequenz verfügt über eine Länge von 548 bp (Abbildung 18). Das nicht codierende 5'-Ende weist eine Länge von 81 bp auf. Durch Vergleich mit den bislang bekannten Insekten-FMOs konnten konservierte Sequenz-Motive wie die Nukleotidbindungsstellen für FAD (AS 35 -40) und NADPH (AS 218 – 223) identifiziert werden. Die Proteinsequenz weist eine Identität von 74,4 % zum korrespondierenden Sequenz-Abschnitt der SNO von *T. jacobaeae* auf. Zur potentiellen PNO von *G. geneura* besteht eine höhere Übereinstimmung von 90,2 % wie auch in ähnlicher Größenordnung zur potentiellen PNO von *A. caja* (92,9 %). Auch konnte mit SignalP 3.0 (Kap. 2.6.11) eine den potentiellen PNOs bzw. der SNO gleichende N-terminale Signalsequenz identifiziert werden, die nach Aminosäure 23 eine Schnittstelle aufweist. Die bestehenden Übereinstimmungen zur potentiellen PNO von *G. geneura* (Kap. 3.3.5) bzw. zur SNO von *T. jacobaeae* (Naumann et al., 2002) legt die Vermutung nahe die gesuchte PNO gefunden zu haben.

```

1  GACATTACATACATTGCAGTGCGGCCCGGGCGCACGCTTATAACGTTTTGCTACAACATAT  60
61 AATAACTATTACAAATATAAAATGTATCGGACATGTAGGCTATTAATAGTGTGAGTTTG 120
1  M Y R T C R L L I V L S L 13

121 TTACACTTACTTTCTTCAAGTGTCTCGCTCAATCTAACCCACCGTCTCGAGTATGCATC 180
14 L H L L S S Q V L A Q S N P P S R V C I 33

181 ATCGGTTCCGGTTACTCAGGCCTTGCCGCAGCAAGGTATATGCAAGACTTTGGCCTCAAC 240
34 I G S G Y S G L A A A R Y M Q D F G L N 53
      FAD-Bindungsstelle      Primer 6
241 TATACAGTATTCGAAGCTACACGTAATATTGGGGGACGTGGAGATACGATCCTAGGGTG 300
54 Y T V F E A T R N I G G T W R Y D P R V 73

301 GGTACAGATGAAGATGGATTACCTATATTTAGCAGCCAATATAAGAATCTAAGGACAAAT 360
74 G T D E D G L P I F S S Q Y K N L R T N 93

361 TCTCCATATAAGATAATGGAATTCACGATTATTCATCCCAGAAGGTACTCGTTCGTTT 420
94 S P Y K I M E F H D Y S F P E G T R S F 113

421 ATCAGTGGAGATTGCTTCTATAAGTATATTAATCTTTTCGTTAGACATTTTAGATTGATG 480
114 I S G D C F Y K Y I K S F V R H F R L M 133

481 GACAACATTCAGGTGCGAAGTCTGGTAACCTGGGTAGAATGGACGGGAGACAGTTGGAAC 540
134 D N I Q V R S L V T W V E W T G D S W N 153

541 CTAACGTATATGAAGACTGACACCAGGCAAAATTATACGGAAGAATGTGATTTTGTGTGC 600
154 L T Y M K T D T R Q N Y T E E C D F V V 173

601 GTAGCAACCGGGGAATACAGTACCCCAAAATACCTCACATCAAAGGACAAGAGTTATAT 660
174 V A T G E Y S T P K I P H I K G Q E L Y 193

661 AAAGGAAAAACAATGCATAGTCACGATTATAAAGACCCTGAAGATTTTCGTGGCCAAAGC 720
194 K G K T M H S H D Y K D P E D F R G Q S 213

721 GTGATGCTCATAGGAGCTGGTCCATCAGGACTCAATCTTGCGGTGCAGCTTTCTAACGTC 780
214 V M L I G A G P S G L N L A V Q L S N V 233
      NADPH- Bindungsstelle      Primer 8
781 ACCTCGAAATTAGTGCACAGTCATCATATTATTAAGTCTTTCAAAATCTACAACCAGCCA 840
234 T S K L V H S H H I I K S F K I Y N Q P 253
      PNO-Sequenz-Motiv

841 GATTTTCC 848
254 D F P 256

```

Abbildung 18: Teilsequenz der cDNA und Proteinsequenz der potentiellen PNO von *Arctia villica* :

N-terminale Signalsequenz von Aminosäure (AS) 1 – 23 (fett). Die Sequenz verfügt über die FMO-typische FAD-Bindungsstelle von AS 35 – 40 und die NADPH-Bindungsstelle AS 218 – 223 (fett und kursiv). Die Nukleinsäure-Bindungsstellen der eingesetzten, degenerierten Primer 6 und 8 sind unterstrichen. Die Sequenz von *A. villica* weist das mutmaßlich PNO-spezifische Sequenz-Motiv von AS 250 – 256 auf (fett und kursiv) , so dass Primer 8 erfolgreich eingesetzt werden konnte.

### 3.3.9 PNO *Pericallia matronula*

Zur Erweiterung der bisherigen SNO-Sequenz-Informationen innerhalb der Arctiiden wurde *Pericallia matronula* als Vertreter einer vierten Gattung molekularbiologisch auf die Existenz einer PNO untersucht. Da bei *T. jacobaeae* der Fettkörper als Hauptexpressionsorgan identifiziert (Naumann, 2003) und die RNA der PNO von *G. geneura* (Kap. 3.3.5) bzw. die RNA der potentiellen PNOs der *Arctia*-Arten (Kap. 3.3.7) aus dem Fettkörper isoliert werden konnten, wurde aus dem Fettkörper Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.6.2) und in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.6.3).

Zur Erhöhung der Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt wurde in der ersten Stufe einer Semi-Nested-PCR Primer 6 (Abbildung 10, S. 68) und der Oligo(dT)-Primer (Kap. 2.4) in einem „Touchdown“-Temperaturprogramm eingesetzt (s. u.). Die erhaltene Lösung der PCR-Produkte wurden 1:100 mit 10 mM Tris-Puffer verdünnt und direkt in einer zweiten PCR mit Primer 7 (Abbildung 14, S. 75) und dem Oligo(dT)-Primer in einem Temperaturprogramm mit konstanter Annealingtemperatur (s. u.) eingesetzt. Das erhaltene ca. 750 bp große Amplifikat wurde kloniert (Kap. 2.6.5) und sequenziert (Kap. 2.6.11).

TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION DES 3'-ENDES DER POTENTIELLEN PNO VON  
*P. MATRONULA* MIT DEGENERIERTEN PRIMERN  
ERSTE STUFE DER SEMI-NESTED-PCR

+ 94°C	2 min	} 30 Zyklen, in denen die Annealingtemperatur um 0,5°C je Zyklus verringert wurde.
+ 94°C	45 sec	
+ 65°C - + 50°C	1 min	
+ 72°C	4 min	
+ 94°C	45 sec	} 5 Zyklen
+ 50°C	1 min	
+ 72°C	4 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	

TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION DES 3'-ENDES DER POTENTIELLEN PNO VON  
*P. MATRONULA* MIT DEGENERIERTEN PRIMERN  
ZWEITE STUFE DER SEMI-NESTED-PCR

+ 94°C	2 min	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 55,6°C	1 min	
+ 72°C	4 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	



Zur Vervollständigung des 730 bp langen das 3'-Ende enthaltenen Fragmentes wurden 5'-RACE-Primer entworfen (Abbildung 19) und für die 5'-RACE (Kap. 2.6.4.3) eingesetzt. Trotz vielfältiger Ansätze konnte kein passendes 5'-Ende amplifiziert werden. Dies ist vermutlich auf die nach längerer Lagerung schlechte RNA-Qualität zurückzuführen, die in praktisch jeder Gelkontrolle der RNA-Präparationen erkennbar war. Die weitere Vervollständigung musste deshalb verschoben werden bis wieder frisches Material vorliegt. Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit konnten jedoch die Arbeiten im Rahmen dieser Arbeit nicht fortgeführt werden.

Primer 30	1. Genspezifischer Primer [GSP1] zur cDNA-Synthese der 5'-RACE	
5'- TCT TAT CCC GAG AGG GTA AAT – 3'		$T_m = + 55,9^{\circ}\text{C}$
Primer 31	GSP2 der 5'-RACE	
5'- TAC GAA TGT CAT TGT GGG CTG GTT TAT – 3'		$T_m = + 61,9^{\circ}\text{C}$
Primer 32	GSP3 der 5'-RACE	
5'- AAA CAC ATA GTT CTC TGT CGC AGT AAT T – 3'		$T_m = + 60,7^{\circ}\text{C}$
Abbildung 19: 5'-RACE Primer für die Identifizierung der cDNA der potentiellen PNO von <i>P. matronula</i>		

Das gefundene Fragment verfügt über einen codierenden Teil von 630 bp und ein nicht codierendes 3'-Ende von 97 bp. Die bei den bislang bekannten Insekten-FMOs bzw. den bekannten Arctiiden-FMOs konservierte Sequenz-Motiv, welches z. B. bei der potentiellen PNO von *G. geneura* der Aminosäuresequenz von 326 – 332 entspricht (Kap. 3.3.6, Abbildung 13), trat bei diesem Fragment von Aminosäureposition 77 - 83 auf und legt die Vermutung nahe eine FMO gefunden zu haben. Die Tatsache, dass das Fragment durch Verwendung des Primers 7 amplifiziert werden konnte, legt die Vermutung nahe einen Teil der cDNA der potentiellen PNO von *P. matronula* gefunden zu haben.

Primer 7

```

1  TATAACCAACCTGATTTCCCTAAGACTTATATAAAATAAACAGATTTAAAACATTTCACA 60
1  Y N Q P D F P K T Y I N K P D L K H F T 20
   PNO-Sequenz-Motiv
61  CCAAATGGTGCTGTATTCGAGGACGATACCTTTGAAGACGTCGATATTGTCATATATTGC 120
21  P N G A V F E D D T F E D V D I V I Y C 40

121 ACAGGTTACAAATACTACCTTCCATTCTTGAACCATCTATCCAGCAGAATTACTGCGACA 180
41  T G Y K Y Y L P F L N H L S S R I T A T 60

181 GAGAACTATGTGTTTCCACTGTATCAACAGGTGGTGAATATAAACAGCCCACAATGACA 240
61  E N Y V F P L Y Q Q V V N I N Q P T M T 80
                                   Konservierte
241 TTCGTAGGAGTATCTAAGACTACTTTTTCGAGAATTCTGGATGTACAGGCTGAATATTCA 300
81  F V G V S K T T F A R I L D V Q A E Y S 100
   Region
301 GCAGCGTTAGCAGCAGGCCGTTTAAATTTACCCTCTCGGGATAAGATGTTACGCCACTGG 360
101 A A L A A G R F N L P S R D K M L R H W 120

361 CTGAACACGCACACACGCTCAGACAGGAAGGTTTTAAATCACAGATGTCAACAGCGTT 420
121 L E H A H T L R Q E G F K I T D V N S V 140

421 GAACATGATGAGCTTAAATATTTGAAGATCTACATAAAGAAGCTGGTATTTCAGAAAGTG 480
141 E H D E L K Y F E D L H K E A G I Q K V 160

481 CCTTTTGCATTCAAAGCCCTTACTCAGTTCAACATAAAGAATGCACTTGAGGACCTTTTA 540
161 P F A F K A L T Q F N I K N A L E D L L 180

541 CATTTTCGTGATTATGATTACAAGATCTTTAGCGATACTCAATATGAAAGACGTCATAAT 600
181 H F R D Y D Y K I F S D T Q Y E R R H N 200

601 CCTAGAAAGGAGGAATGCCCTTTTGATGTATGAAAAAACAGAGAGAATAAATGAACACGA 660
201 P R K E E C P F D V * 220

661 GATGTAATTGTCAACAGTTGTATATTTTGTAATAAATAAATAAATAAATGCTTTGTTGTT 720
721 AAAAAAAAAA 730

```

Abbildung 20: cDNA- und Proteinsequenz vom 3'Fragment der potentiellen PNO von *Pericallia matronula*:

Die Nukleinsäure-Sequenz der Bindungsstelle für Primer 7 ist unterstrichen. Die Sequenz verfügt ebenfalls über die Aminosäuresequenz (AS) 77 – 83 (fett + kursiv), die über die Artgrenzen hinweg bei den Insekten-FMOs konserviert ist (Abbildung 13 S. 74).

### 3.3.10 Flavin-abhängige Monooxygenasen von *T. jacobaeae*

Bei der Suche nach den Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxygenasen (PNO's) konnte sowohl bei *A. caja* (Kap. 3.3.3 bzw. 3.3.7) als auch bei *A. villica* (Kap. 3.3.4 bzw. 3.3.8) jeweils eine FMO und die potentielle PNO identifiziert werden. Zur Überprüfung ob auch *T. jacobaeae* über eine weitere FMO neben der SNO verfügt, wurde zur Untersuchung Primer 10 (Abbildung 14, S. 75) eingesetzt, dessen Spezifität für eine potentielle FMO, die sich von der SNO unterscheidet, durch die Kenntnis von drei weiteren FMO-Sequenzen verbessert werden konnte (Kap. 3.3.6).

Da die genaue Gewebe-Lokalisation der gesuchten FMO nicht bekannt war, wurde Gesamt-RNA aus einer vollständigen Raupe von *T. jacobaeae* isoliert (Kap. 2.6.2) und wie in Kap. 2.6.3 beschrieben in cDNA umgeschrieben. Die unspezifische Vervielfältigung von für Flavin-abhängige Monooxygenasen codierende Sequenzen wurde im ersten Schritt mit den Primern 1 und 3 (Kap.

3.3.1) in einem "Touchdown"-Programm durchgeführt (Kap. 2.6.4.1), in dem im Gegensatz zur üblichen Vorgehensweise 5 zusätzliche Zyklen (insgesamt 40 Zyklen) durchlaufen wurden (s. u.). Die Produktlösung dieser PCR wurde 1:100 verdünnt und direkt im zweiten Schritt der Nested-PCR eingesetzt.

TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION EINES INTERNEN FRAGMENTS DER FMO VON *T. JACOBABAEAE*  
FÜR DEN ERSTEN UND ZWEITEN SCHRITT DER NESTED-PCR

+ 94°C	2 min	} 30 Zyklen, in denen die Annealingtemperatur um 0,5°C je Zyklus verringert wurde.
+ 94°C	45 sec	
+ 60°C - + 45°C	1 min	
+ 72°C	4 min	
+ 94°C	45 sec	} 10 Zyklen
+ 45°C	1 min	
+ 72°C	4 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	

Unter Verwendung von Primer 6 (Kap. 3.3.5) und dem zur Amplifizierung von Arctiiden-FMOs konstruierten Primer 10 (Kap. 3.3.6, Abbildung 13) konnte mit demselben Temperaturprogramm erfolgreich ein ca. 550 bp großes Amplifikat vervielfältigt werden. Das Amplifikat wurde kloniert (Kap. 2.6.5) und die erhaltenen Klone routinemäßig einer Restriktionskontrolle mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* unterzogen (Kap. 2.6.6). Das Ergebnis zeigte bereits zwei differenzierbare Klon-Subpopulationen, von denen jeweils ein Klon für die Plasmidsolierung (Kap. 2.6.10) und nachfolgende Sequenzierung (Kap. 2.6.11) ausgewählt wurde. Die Sequenzierung offenbarte zwei interne Fragmente von Sequenzen, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den bislang bekannten Arctiiden-Sequenzen den Flavin-abhängigen Monooxygenasen zugeordnet werden können. Eine der Sequenzen zeigt eine etwas höhere Übereinstimmung auf Proteinebene zur FMO von *A. caja* mit einer Identität von 89,4 %. Diese wird im Folgenden als TjFMO1 bezeichnet (Abbildung 23). Die zweite Sequenz weist mit 86 % Identität eine nur etwas geringere Übereinstimmung zur FMO von *A. caja* auf. Diese wird im Folgenden als TjFMO2 bezeichnet (Abbildung 24).

Primer 33	1. Gen-spezifischer Primer (GSP1) für die Synthese von cDNA	
5'- GAT GGG CCG GCT CCT ATC A - 3'		$T_m = + 61,0^{\circ}\text{C}$
Primer 34	GSP2 der 5'-RACE	
5'- GAA GTA AGG TAC ATG AGG TGC GGT AAA T - 3'		$T_m = + 63,7^{\circ}\text{C}$
Primer 35	GSP3 der 5'-RACE	
5'- TTC CAA TTG TCA TCC ACC TTC TCA ACA TT - 3'		$T_m = + 62,4^{\circ}\text{C}$
Primer 36	3'-RACE-Primer	
5'- CCT ACC GGT GTT TTA TCC TCA TTT CTT T - 3'		$T_m = + 62,2^{\circ}\text{C}$
Abbildung 21: RACE-Primer für die Identifizierung des 5' bzw. 3'-Endes der cDNA der FMO1 von <i>T. jacobabaeae</i> .		

Für die Vervollständigung der Sequenzen mit der RACE-Technik (Kap. 2.6.4.3) wurden Genspezifische Primer konstruiert (Abbildung 21 bzw. 22). Die beiden gefundenen internen Fragmente verfügen zueinander über eine Identität auf Aminosäureebene von 83,7 %. Daher wurde beim Entwurf darauf geachtet, dass die Primer jeweils nur für eine der beiden Sequenzen spezifisch sind.

Primer 37      1. Genspezifischer Primer (GSP1) für die Synthese von cDNA  
5'- ATG GGC CGG CCC CAA CTA – 3'       $T_m = + 60,5^\circ\text{C}$   
Primer 38      GSP2 der 5'-RACE  
5'- CGA AGT AAG GTA TAT GTG GTG CGA TGT A – 3'       $T_m = + 63,7^\circ\text{C}$   
Primer 39      GSP3 der 5'-RACE  
5'- TCT CCC ACC CGC TCA ACA CCA GTT A – 3'       $T_m = + 66,3^\circ\text{C}$   
Primer 40      3'-RACE-Primer  
5'- TTC CCA CAA GGT TCT AGT TCA TGT TTA T – 3'       $T_m = + 60,7^\circ\text{C}$   
Abbildung 22: RACE-Primer für die Identifizierung des 5'- bzw. 3'-Endes der cDNA der FMO2 von *T. jacobaeae*.

```

Primer 6
1  GGGGGGACGTGGAGGTACACACCTCGAGTCGGCACTGATGAGTATGGAGCGCCCTTGTTTC  60
1  G G T W R Y T P R V G T D E Y G A P L F  20
    Konservierte Region
61  ACGAGCGCGTACAAGAACTTGAGAACAACTCGTTCTATCAGACGATGGAATTCCTCCGAC  120
21  T S A Y K N L R T N S F Y Q T M E F P D  40

121  TACCCGTTCCCTACCGGTGTTTTATCCTCATTTCTTTCTGGGCCCTGTATTTACAAATAC  180
41  Y P F P T G V L S S F L S G P C I Y K Y  60

181  TTGGAAGGTTATACTGAACAATTTAATATAGCAAAATATATTCAGTTCGGAAGCCTGGTG  240
61  L E G Y T E Q F N I A K Y I Q F R S L V  80

241  ACCAATGTTGAGAAGGTGGATGACAATTGGAAGGTCACCTATATGAAGACCGATACGAAG  300
81  T N V E K V D D N W K V T Y M K T D T K  100

301  CAGAACGTGACTGAGGAATGTGGCTTCGTTGTCGTTGCCAACGGGGAATTTACCGCACCT  360
101  Q N V T E E C G F V V V A N G E F T A P  120

361  CATGTACCTTACTTCGCAAAACAAGAAGGCTTTAAAGGAAAGATGTTACACAGCCACGAT  420
121  H V P Y F A K Q E G F K G K M L H S H D  140
                                Konserviertes Sequenz-Motiv
421  TACAGAGATTTAGAAGACTACCGAGGGTTACGAGTGCTGGTGATAGGAGCCGCCCCATCT  480
141  Y R D L E D Y R G L R V L V I G A G P S  160
                                NADPH-Bindungsstelle
481  GCTTTTGACCTCGCTGCACACCTCGTCAACGTGACCTCTATGTTTCATCCACACTCAC  537
161  A F D L A A H L V N V T S M F I H T H  179
                                Primer 10

```

Abbildung 23: Teilsequenz der cDNA- und Proteinsequenz der FMO1 von *T. jacobaeae*. Die Teilsequenz verfügt über das FMO-charakteristische Sequenz-Motiv für die NADPH-Bindungsstelle (-GAGPSA-). Die Sequenz weist darüber hinaus auch Sequenz-Motive auf, die innerhalb der bekannten Insekten-FMOs konserviert sind wie z. B. AS 136 – 142 (fett und kursiv gekennzeichnet, vgl. Abbildung 13, S. 74). Die Nukleinsäure-Sequenzen der Primer-Bindungsstellen sind unterstrichen. Die dazugehörige Proteinsequenz ist fett und kursiv gekennzeichnet.

Für die Amplifizierung der fehlenden Sequenz-Abschnitte wurde aus einer vollständigen Raupe isolierte Gesamt-RNA wie in Kap. 2.6.3 beschrieben mit dem jeweiligen 1. Genspezifischen Primer in cDNA umgeschrieben. Nach Reinigung und Anfügen einer Polycytidinsequenz an das 5'-Ende (Kap. 2.6.4.3) blieben mehrere Versuche die 5'-cDNA-Sequenzbereiche zu amplifizieren ohne Erfolg. Dies ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass die Proben-Tiere vor der Isolierung der Gesamt-RNA 19 Monate bei – 80°C gelagert wurden und nur noch eine unzureichende RNA-Qualität vorlag, die in den Kontrollen der RNA-Präparationen mit Agarose-Gelen erkennbar wurde.

Primer 6	
1 <u>GGCGGGACGTTGGAGATAC</u> ACTCCTCGCGTCGGCACTGATGAGAATGGAGCACCCCTTGTTTC	60
1 <b>G G T W R Y</b> T P R V G T D E N G A P L F	20
61 ACGAGTGCCTATAAGAACTTGAGAACAACTCGTTTTATCAGACGATGGAGTTTCCCGAC	120
21 T S A Y K N L R T N S F Y Q T M E F P D	40
121 TACCCGTTCCACAAAGTTCTAGTTTCATGTTTATCCGGGCCCTGTATTTACAGATACTTG	180
41 Y P F P Q G S S S C L S G P C I Y R Y L	60
181 CAAGGCTACACTAAGCAATTTAATTTGGAAAAGCATATTAAGTTCCAAAACCTGGTAACT	240
61 Q G Y T K Q F N L E K H I K F Q N L V T	80
241 GGTGTTGAGCGGGTGGGAGACAAGTGAACGTCACATATATGAAGACTGACACCAAGGAG	300
81 G V E R V G D K W N V T Y M K T D T K E	100
301 AACGTGTCGAGGAGTGTGGCTTCGTTGTGGTTGCCAACGGGGAGTACATCGCACCACAT	360
101 N V S E E C G F V V V A N G E Y I A P H	120
361 ATACCTTACTTCGCTAAACAGGAAGACTTTCAAGGAAAGATGCTGCACAGCCACGATTAC	420
121 I P Y F A K Q E D F Q G K M <b>L H S H D Y</b>	140
Konserviertes Sequenz-Motiv	
421 AGAGATTCTGAAGACTACCGAGGCCTACGAGTCTTGGTAGTTGGGGCCGGCCCATCTGCT	480
141 <b>R D S E D Y R G L R V L V V G A G P S A</b>	160
NADPH-Bindungsstelle	
481 TTTGACCTCGCGACACACCTTATCAACGTGACTTCCATGTTTCATCCACACAC	534
161 F D L A T H L I N V T S <b>M F I H T H</b>	178
Primer 10	

Abbildung 24: Teilsequenz der cDNA- und Proteinsequenz der FMO2 von *T. jacobaeae*. Die Teilsequenz verfügt über das FMO-charakteristische Sequenz-Motiv für die NADPH-Bindungsstelle (-GAGPSA-). Die Sequenz weist darüber hinaus auch Sequenz-Motive auf, die innerhalb der bekannten Insekten-FMOs konserviert sind wie z. B. AS 135 – 141 (fett und kursiv gekennzeichnet, vgl. Abbildung 13, S. 74). Die Nukleinsäure-Sequenzen der Primer-Bindungsstellen sind unterstrichen. Die dazugehörige Proteinsequenz ist fett und kursiv gekennzeichnet.

Beide Sequenz-Fragmente zeigen neben den über die Artgrenzen hinweg konservierten Sequenz-Motiven auch die für die Flavin-abhängige Monooxygenasen typische NADPH-Bindungsstelle (Abbildung 23 und 24). Durch die doch recht hohe Übereinstimmung zu den Arctiiden-FMOs können die gefundenen internen Fragmente als Teile von Flavin-abhängigen Monooxygenasen identifiziert werden. Ob es sich bei den hier sequenzierten Fragmenten um tatsächlich zwei verschiedene FMOs handelt oder z. B. um cDNA von zwei unterschiedlichen Allelen konnte aufgrund der noch geringen (Sequenz-) Informationen nicht verifiziert werden. Da neues Tier-Material nicht zur Verfügung stand, konnten die Sequenzen im Rahmen dieser Arbeit nicht vervollständigt werden.

### 3.4 Eigenschaften der Arctiiden-FMOs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Reihe von Sequenzen identifiziert und mit den verfügbaren Sequenzen von *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae* (Kap. 3.3.1) bzw. den verfügbaren Lepidopteren-FMOs von *Bombyx mori* und *Helicoverpa armigera* in einem Alignment miteinander verglichen (Abbildung 4 und Abbildung 25). Die cDNA-Sequenz der FMO von *H. armigera* wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Heckel (Max-Planck-Institut f. Chemische Ökologie) zur Verfügung gestellt.

Die identifizierten Sequenzen weisen Strukturmerkmale auf, wie sie für die Flavin-abhängigen Monooxygenasen charakteristisch sind. So verfügen die FMO-Sequenzen der Gattung *Arctia* über typische Sequenz-Motive wie die FAD- (AS 35 – 40, -GAGYSG-) und NADPH-Bindungsstelle (AS 219 – 224, -GAGPSA-). Auch die bei *T. jacobaeae* identifizierten Teilsequenzen verfügen über eine entsprechende AS-Sequenz (-GAGPSA-, Kap. 3.3.10 Abbildung 23 und 24). Die SNO von *T. jacobaeae* und die potentiellen PNOs verfügen ebenfalls über Bindungsstellen für FAD (AS 35 – 40, -GSGY[H]SG-) und NADPH (AS 218 – 223, - GAGPSG-). Für diese Sequenz-Motive (GxGxxG/A) besteht eine hohe Übereinstimmung auch über die Artgrenzen hinweg. So verfügt die als FMO3006 bezeichnete FMO von *D. melanogaster* von AS 8 – 13 über die AS-Sequenz – GAGTAG - (Abbildung 25).

Neben diesen Gemeinsamkeiten liegen eine Reihe von Sequenz-Motiven vor, durch die sich die Arctiiden-FMOs deutlich von der SNO von *T. jacobaeae* und den potentiellen PNOs unterscheiden. In diesem Zusammenhang fiel das Sequenz-Motiv -YNQPDFP- auf, welches bei der SNO (AS 247 – 253 bei *T. jacobaeae*) und den potentiellen PNOs (AS 250 – 256 bei der potentiellen PNO von *A. caya*) mit einer hohen Identität zueinander auftritt, jedoch bei den anderen FMOs fehlt. Dieses Sequenz-Motiv wurde für die Konstruktion von degenerierten Primern eingesetzt (Kap. 3.3.6.), mit denen erfolgreich potentielle PNO-Sequenzen identifiziert werden konnten (Kap. 3.3.7 und 3.3.8). Im Vergleich zu der SNO bzw. den potentiellen PNOs weisen die bei den *Arctia*-Arten identifizierten FMOs an dieser Stelle eine „Lücke“ von fünf Aminosäuren auf, die durch eine bei den *Arctia*-Arten konservierte AS-Sequenz flankiert wird (AS 245 – 250, -DAKIQK-). Um nur wenige Aminosäuren versetzt lässt sich diese „Lücke“ auch bei den FMOs anderer Insekten außerhalb der Arctiiden feststellen. So verfügt *H. armigera* über eine „Lücke“ von 4 AS (AS 239/240).

Für alle identifizierten Arctiiden-FMOs und die potentiellen PNOs, bei denen bereits das 5'-Ende vorliegt, wurde nach Analyse mit SignalP 3.0 eine N-terminale Signalsequenz prognostiziert (Kap. 3.3.3, ff.), die die Sequenzen für den vesikulären Transport adressieren. Für die SNO von *T. jacobaeae* konnte die Exkretion bereits nachgewiesen werden (Naumann, 2003). Nach Vorhersage mit SignalP 3.0 weist die N-terminale Signalsequenz bei den potentiellen PNOs eine Länge von 23 AS und bei den beiden FMOs der *Arctia*-Arten eine Länge von 18 AS auf. Andere biochemische Merkmale wie z. B. Isoelektrischer Punkt u. a. sind bislang nur Vorhersagen, die durch eine Software erstellt worden sind und noch experimentell bestätigt werden müssen. Grundlegende Unterschiede zwischen den FMOs und den PNOs bzw. zur SNO sind jedoch nicht erkennbar. So sind die FMO-Sequenzen der Gattung *Arctia* mit einer vorhergesagten Gesamtlänge von 451 Aminosäuren nur um sechs bzw. acht Aminosäuren kürzer als die potentiellen PNOs bzw. die SNO. Auch andere mutmaßliche Eigenschaften weichen nur gering von den für die potentiellen PNOs gemachten Vorhersagen ab.

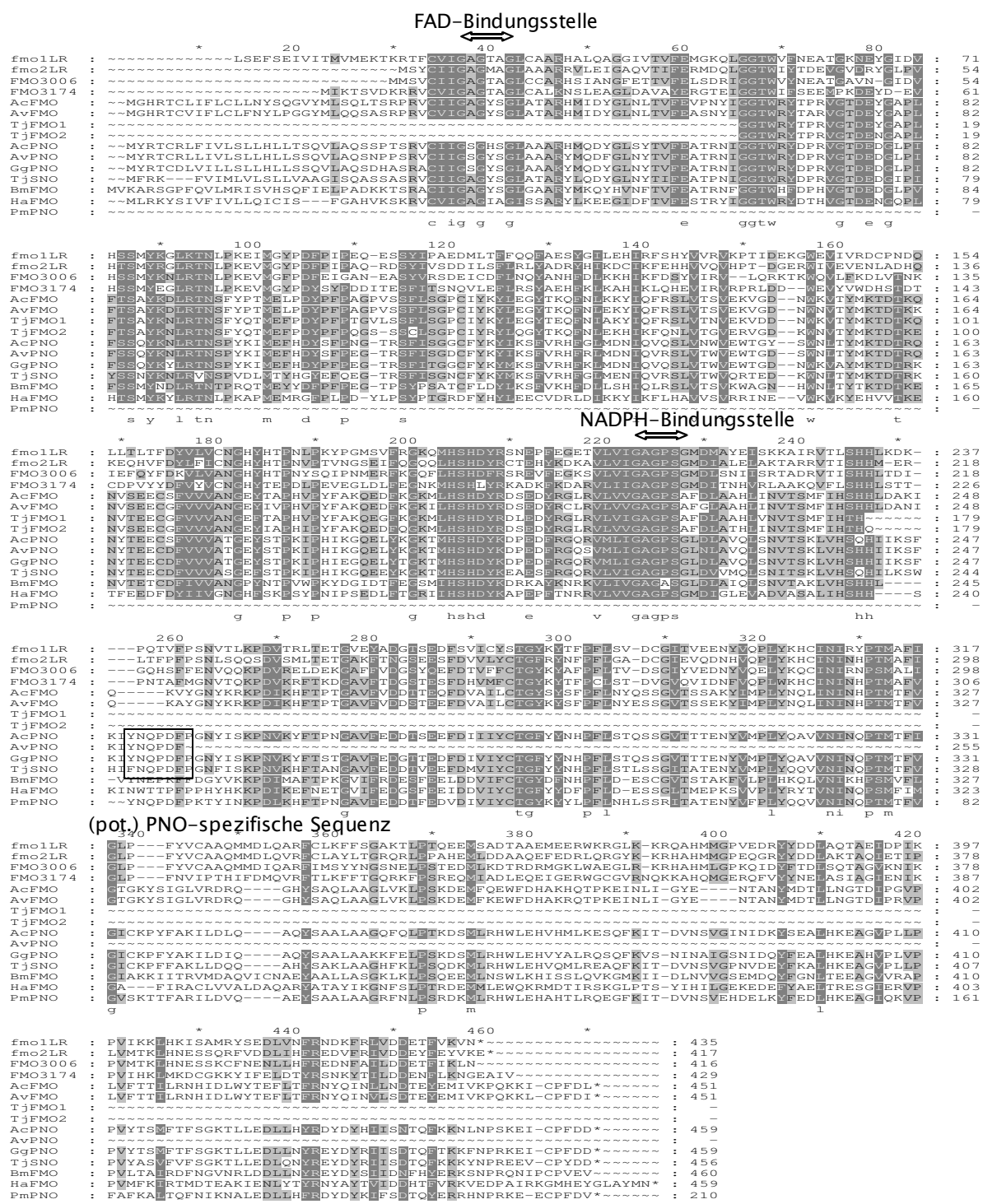


Abbildung 25: 3. Alignment Flavin-abhängiger Monooxygenasen der Insekten

Weißer Doppelpfeil oberhalb der dazugehörigen AS-Sequenz kennzeichnen die FAD- (AS 32 – 37 bei *T. jacobaeae*) bzw. die NADPH-Bindungsstelle (AS 215 – 220). Die potentiell spezifische Teilsequenz der potentiellen PNOs bzw. der SNO von *T. jacobaeae* ist eingrahmt (AS 247 -253 bei *T. jacobaeae*). fmo1 + fmo2: FMO1 + 2 von *Anopheles gambiae*, FMO3006 + 3174: FMO1 + 2 von *Drosophila melanogaster*, AcFMO: FMO von *Arctia caja*, AvFMO: FMO von *Arctia villica*, TjFMO1: FMO 1 von *Tyria jacobaeae*, TjFMO2: FMO 2 von *Tyria jacobaeae*, AcPNO Pyrollizidinalkaloid-N-Oxygenase von *Arctia caja*, AvPNO: PNO von *Arctia villica*, GgPNO: PNO von *Grammia geneura*, TjSNO: SNO von *Tyria jacobaeae*, HaFMO FMO von *Helicoverpa armigera*, BmFMO FMO von *Bombyx mori*; Bereiche hoher Konserviertheit sind dunkelgrau, Bereiche mit geringerer Konserviertheit hellgrau hervorgehoben.

### 3.5 Expression der rekombinanten SNO von *T. jacobaeae* in Sf9-Zellen

#### 3.5.1 Transiente Expression

Für die Expression der rekombinanten SNO (rSNO) von *T. jacobaeae* zeigten Ergebnisse in *E. coli*, dass das rekombinante Enzym ausschließlich in Form von nicht löslichen Proteinaggregaten sogenannten Einschlusskörpern („Inclusion bodies“) exprimiert werden konnte (Naumann, 2003). Durch Solubilisierung und anschließende Dialyse ließen sich teilweise aktive Proteinchargen erzeugen, die jedoch am pH-Optimum der nativen SNO von 7,0 nicht stabil löslich waren (Naumann, 2003). Eine biochemische Enzym-Charakterisierung der rSNO konnte deshalb nur im Dialysepuffer (pH= 8,5) erfolgen (Naumann et al., 2002). Bei der heterologen Expression von eukaryontischen Proteinen in prokaryontischen Expressionssystemen können derartige Einschlusskörper auf eine falsche Proteinfaltung zurück zu führen sein, die in Verbindung z. B. mit einer fehlenden oder falschen Verknüpfung von Disulfidbrücken zu einer nicht nativen Konformation führt. Auch für die Proteineigenschaften bzw. die Aktivität potentiell notwendige, posttranslationale Modifikationen können häufig in einem Prokaryonten nicht ausgeführt werden. Weitere Expressionen sollten deshalb mit einem eukaryontischen Expressionssystem unternommen werden, dessen Expressionsorganismus möglichst nahe mit den Lepidopteren bzw. Arctiiden verwandt ist. Hierfür bot sich die Expression in Insektenzellen an, wie sie durch das Bac-to-Bac® Expressionssystem (Invitrogen) zur Verfügung stand (Kap. 2.7.3).

Die Expression mit dem Bac-to-Bac® Expressionssystem erfolgte durch die Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren. Die Sf9-Zellen leiten sich von ovariellen Geweben der Art *Spodoptera littoralis* ab, die innerhalb der Lepidopteren zur Familie der Noctuidae gehört. Aufgrund dieser nahen Verwandtschaft mit den Arctiiden konnte erwartet werden, dass die für den vesikulären Transport adressierende, native Signalsequenz erkannt wird und die rekombinante SNO beim vesikulären Transport die Faltung und posttranslationalen Modifikationen dem nativen Enzym entsprechend erhält. Dies erschien als besonders wichtig, um im Vergleich zu der in *E. coli* exprimierten, rSNO zuverlässig größere Mengen richtig gefalteter, aktiver Enzyme zu erhalten, um biochemische Untersuchungen durchführen zu können. Die Erkennung der Signalsequenz durch Sf9-Zellen und die erfolgreiche Sekretion einer geringen Menge der exprimierten SNO von *T. jacobaeae* mit C-terminalen Affinitätstags in Medium konnte bereits im Vorfeld durch Aktivität belegt werden (Naumann, 2003). Zu Beginn dieser Arbeit stand bereits eine Virusstocklösung von rekombinanten Baculoviren des Bac-to-Bac® Expressionssystems zur Verfügung, die nach der Transfektion durch zwei Infektionszyklen vermehrt worden war (Naumann, 2003). Das verwendete Klonierungskonstrukt TMSHT6 (Naumann, 2003; Kap. 2.7.1) im Vektor pFASTBac1 (Kap. 2.3) wies neben der N-terminalen Signalsequenz einen C-terminalen Affinitätstag auf, der eine einfache Reinigung und Konzentrierung der exprimierten Proteine durch eine Affinitätschromatographie ermöglichen sollte (Kap. 2.9.11).

Für die heterologe Expression der rSNO von *T. jacobaeae* wurden Sf9-Zellen mit den rekombinanten Baculoviren der hergestellten Virusstocklösung infiziert. Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgt dann als begleitender Prozess der Virus-Vervielfältigung. Sie ist somit Teil eines jeden Vermehrungszyklus und unterliegt damit der zeitlichen Organisation der Virusreplikation. Das Auftreten und die Dauer der Proteinexpression ist von einer Reihe von Faktoren wie dem zu exprimierenden Protein und den Wachstumsbedingungen (Kap. 2.1.7) abhängig und muss jedesmal empirisch ermittelt werden. Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein



weiterer, die Expression beeinflussender Faktor untersucht: Das Verhältnis der Anzahl aktiver Viren zu der Menge der für die Infektion vorliegenden Zellen beeinflusst die Dauer und das Ausmaß der Expression. Für die Bestimmung der Anzahl aktiver Viren (Virustiter) wurde ein leicht modifizierter Plaque-Test nach King und Possee (1992) durchgeführt (Naumann, 2003, Kap. 2.7.2). Dieser nutzt die nach der Virusvermehrung erfolgende Lyse der Wirtszellen als Bestimmungskriterium. In einer ansonsten geschlossenen, adhärent wachsenden Zellschicht der Sf9-Zellen fallen die Flächen, auf denen sich vermehrungsfähige Viren befanden, als zellfreie Zonen auf. Diese als Plaque bezeichneten Flächen müssen zur Berechnung der „Plaque forming Units“ (pfu) je Mililiter der Virusstocklösung ausgezählt werden (Kap. 2.7.2). Zur Kontrastierung wurden die Sf9-Zellen nach Abschluss der Inkubationszeit mit Neutralrot gefärbt. Mit den Ergebnissen der Virustiter-Bestimmung lässt sich für die Proteinexpression das Verhältnis von aktiven Viren bzw. der pfu zur Anzahl der Wirtszellen berechnen (MOI, Multiplicity of Infection).

Zur Quantifizierung der „Plaque forming Units“ der Virusstocklösung wurden mehrfach Bestimmungen durchgeführt (Kap. 2.7.2). Die Ergebnisse waren jedoch nicht auswertbar, da die Sf9-Zellen nach Aussaat eine nur ungenügende Proliferation aufwiesen, so dass nur wenige Plaques erkennbar waren, die ausreichend klar abgegrenzt waren. Zur Optimierung der Methode wurde die Aussaatmenge der Sf9-Zellen von  $1 \cdot 10^6$  Zellen auf 3 bzw.  $5 \cdot 10^6$  Zellen je Wachstumsfläche erhöht. Eine Verbesserung konnte jedoch nicht erreicht werden. Auch der Einsatz einer auf den pH-Wert von 6,2 des Mediums TC100 eingestellten Agarose-Lösung und eine Übersichtung der Ansätze mit je 1 ml Medium nach 3 Tagen verbesserte das Wachstum der Zellen nicht. Da auch die zur besseren Kontrastierung eingesetzte Kristallviolett-Lösung (Kap. 2.7.2) die Auswertbarkeit nicht verbesserte, erfolgten keine weitere Virustiter-Bestimmungen und die erforderliche Virusmenge bzw. das für die Expression erforderliche Volumen der Virusstocklösung wurde empirisch ermittelt. Hierfür wurden in einem Expressionsscreening (Kap. 2.7.3) verschiedene Volumina einer 1:200 Verdünnung der Virusstocklösung zur Infektion von  $5 \times 10^5$  Sf9-Zellen einer adhärent wachsenden Kultur (Mikrotiterschale) verwendet (Kap. 2.5.3.2). Im ersten Expressionsscreening mit Monolayerkulturen konnte mit einem polyklonalen Antikörper (Naumann, 2003) für die Infektion mit 60 µl der 1:200 Verdünnung nach 108 Stunden eine Expression des rekombinanten Proteins im Medium (Western-Blot, Kap. 2.9.6) nachgewiesen werden.

Um mehr Informationen über das Expressionsintervall zu erhalten, wurde ein weiteres Expressionsscreening (Kap. 2.7.3) durchgeführt. Hierbei wurden von einem weiteren Expressionsansatz in einem Zeitintervall von 102 – 112 Stunden alle zwei Stunden Proben des Mediums genommen und auf Expression mit dem Westernblot (Kap. 2.9.8) geprüft. Die Analyse der einzelnen Proben ergab, dass innerhalb des untersuchten Zeitintervalls von 102 – 112 Stunden die rekombinante SNO in jeder Probe nachgewiesen werden konnte. Für die Prüfung auf Aktivität wurden 5 µl Mediumüberstand, die nach einer Inkubationszeit von 108 h abgenommen wurde, mit der qualitativen Aktivitätsbestimmung mit radioaktivem Senecionin untersucht (Kap. 2.10.1). Die Auswertung nach chromatographischer Trennung der Aktivitäts-Proben indizierte eindeutig eine Umsetzung des radioaktiven Senecionins, welches nach Vergleich mit den radioaktiven Referenzen als Senecionin *N*-Oxid identifiziert werden konnte. Die enzymatische Aktivität und die Ergebnisse des Westernblots belegten die Expression der rekombinanten SNO von *T. jacobaeae* in aktiver Form in Sf9-Zellen.

Da nach Herstellerprotokoll mit Suspensionskulturen größere Mengen an rekombinanten Proteinen zu erwarten sind, wurden Sf9-Zellen an die Wachstumsbedingungen der Suspensionskultur mit dem

proteinfreien Medium InsectXPress adaptiert (Kap. 2.5.3.2) und für die Expression auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Für die Expression wurden die Zellen mit jeweils 120 µl/ml Zellsuspension der schon zuvor eingesetzten 1:200 Verdünnung der Virusstocklösung infiziert. Die Inkubation wurde nach 108 Stunden beendet und die Zellen durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt. Das erhaltene Volumen von 11,8 ml wurde mit einem Zentrifugationskonzentrator auf 600 µl konzentriert (19,7 -fach). Zur Reinigung der rekombinanten SNO wurden 500 µl von dem erhaltenen Konzentrat mit dem Bindungspuffer der Affinitätschromatographie (Kap. 2.9.11) auf 2,5 ml verdünnt und mit einer PD10 Säule auf Bindungspuffer umgepuffert (Kap. 2.9.1). Die Reinigung erfolgte wie in Kap. 2.9.11 beschrieben mit der Ni-NTA-Agarose (Qiagen). Durch den grösseren Expressionsansatz konnte eine höhere Ausbeute erwartet werden, so dass Proben der einzelnen Reinigungsstufen nach elektrophoretischer Auftrennung durch eine Coomassie-Färbung (Kap. 2.9.5) detektiert werden sollten. Erste Versuche das rekombinante Protein in Volumina von 20 bzw. 50 µl der Elutionsfraktionen mit der Coomassiefärbung nachzuweisen führten zu keinem Erfolg. Erst nach Fällung (Kap. 2.9.2) der vollständigen 4. Elutionsfraktion (400 µl) konnte eine schwache, ca. 50 kDa große Proteinbande detektiert werden (Abbildung 26, Probe 5). Das rekombinante Referenzprotein, welches in *E. coli* exprimiert worden war (Naumann, 2003), zeigte zu dem rekombinanten Protein, welches in Sf9 -Zellen exprimierten worden war, eine kleinere Molekularmasse (Abbildung 26, Proben 1 – 4). Diese könnte durch posttranslationale Modifikationen bedingt sein, die an dem in Sf9-Zellen exprimierten Protein ausgeführt worden waren.

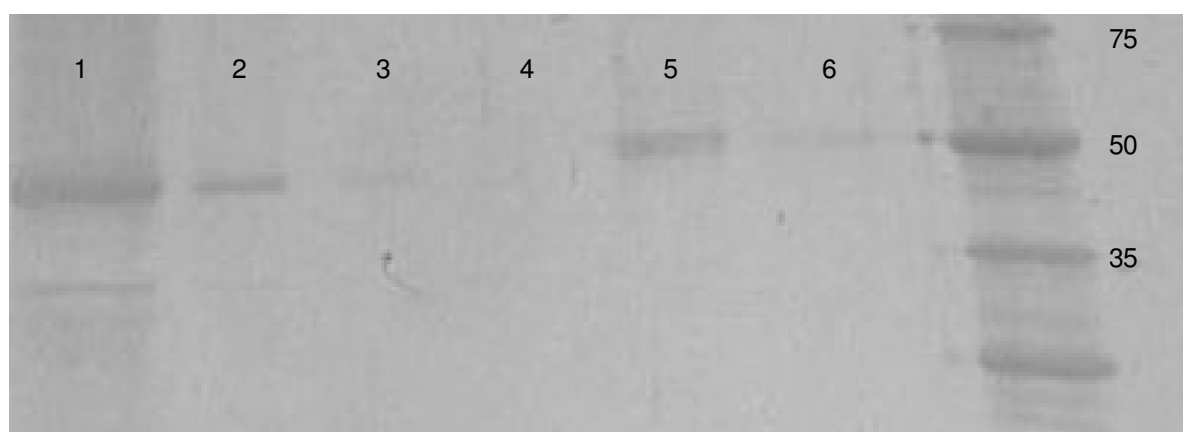


Abbildung 26: Heterologe Expression der rSNO von *T. jacobaeae* in einer Sf9-Suspensionskultur. SDS-Gel, welches mit Coomassie-Färbung (Kap. 2.9.5) detektiert wurde. Von der in *E. coli* exprimierten rSNO wurden jeweils 5 µl der Stammlösung bzw. Verdünnungen der Stammlösung aufgetragen (Proben 1-4). 1: Unverdünnt aufgetragene rSNO-Stammlösung, die eine Protein-Konzentration von 0,512 g/ml hatte. 2: 1:5 Verdünnung der rSNO-Stammlösung. 3: 1:10 Verdünnung der rSNO-Stammlösung. 4: 1:20 Verdünnung der rSNO-Stammlösung. 5: TCA-Fällung (Kap. 2.9.2) der vollständigen 4. Elutionsfraktion. 6: TCA-Fällung der vollständigen 3. Elutionsfraktion. Ganz rechts wurde eine Proteinleiter aufgetragen. Die Zahlenangaben bezeichnen die Molekulare Masse der einzelnen Proteine in kDa.

Proben der Aufarbeitungsstufen wie zentrifugierter Mediumüberstand, Konzentrat und Elutionsfraktionen wurden mit dem qualitativen, radioaktivem Aktivitätstest (Kap. 2.10.1) auf Aktivität geprüft. Erwartungsgemäß konnte sowohl im Mediumüberstand als auch im Konzentrat Aktivität nachgewiesen werden. In den Elutionsfraktionen hingegen konnte erst nach einer Inkubation von 3 Stunden ein nur minimaler Umsatz detektiert werden. Dies korrelierte mit den Ergebnissen der SDS-PAGE (Kap. 2.9.4), die mit der Coomassie-Färbung detektiert wurden. Für eine biochemische Charakterisierung fehlte eine ausreichende Menge des rekombinanten Proteins.

Dies in ausreichender Menge zu exprimieren und zu reinigen war Ziel von nachfolgenden größeren Expressionsansätzen. In den folgenden Expressionsansätzen konnte die SNO wiederholt aktiv exprimiert werden, ohne jedoch die Ausbeute steigern zu können.

Um zu prüfen inwieweit degradierende Proteasen, die nach der Lyse von infizierten Zellen in das Medium entlassen werden, das Scaling Up negativ beeinflussen, wurde die Wirkung zweier Proteaseinhibitoren untersucht. Hierfür wurden zwei Proteaseinhibitoren ausgewählt, die ein relativ breites Spektrum an Proteasen hemmen können (Rehm, 2000). Diese wurden dem Medium von Expressionsansätzen (Monolayer, Kap. 2.5.3.2) nach einer Inkubationszeit 101 Stunden zugesetzt. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ist ein Komplexbildner, der kationenabhängige Proteasen effektiv durch Entzug der Kationen zu hemmen vermag. EDTA wurde in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt. Zusammen mit dem EDTA wurde der Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) den Ansätzen in einer Konzentration von 10  $\mu$ M zugefügt. Parallel wurden Vergleichsansätze ohne Inhibitoren inkubiert. Im Zeitraum von 102 – 112 Stunden wurden alle zwei Stunden Proben der Expressionsansätze genommen.

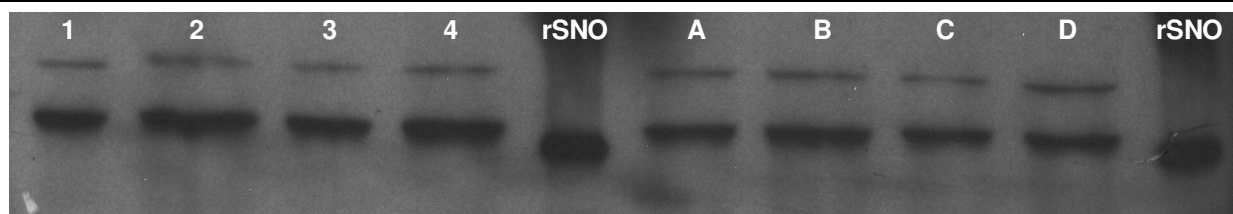


Abbildung 27: Heterologe Expression der rSNO von *T. jacobaeae* mit und ohne Protease-Inhibitoren. Volumina der Mediumüberstände der Expressionsansätze wurden mit der TCA-Fällung gefällt (Kap. 2.9.2) und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem spezifischen, polyklonalem Antikörper (Western-Blot, Kap. 2.9.8). Die Proben 1 – 4 wurden von Expressionsansätzen ohne und die Proben A – D von Expressionsansätzen mit Protease-Inhibitoren abgenommen. Als Protease-Inhibitoren wurden 1 mM EDTA und 10  $\mu$ M PMSF eingesetzt. rSNO: Rekombinante SNO mit einer Molekularmasse von ca. 50 kDa, die in *E. coli* exprimiert wurde (Naumann, 2003). 1 + 2: 100 bzw. 150  $\mu$ l Probe nach einer Inkubationszeit von 102 h. 3 + 4: 100 bzw. 150  $\mu$ l der Probe nach einer Inkubationszeit von 108 h. A + B: 100 bzw. 150  $\mu$ l der Probe nach einer Inkubationszeit von 102 h. C + D: 100 bzw. 150  $\mu$ l der Probe nach einer Inkubationszeit von 108 h.

Die Mediumüberstände wurden nach Abtrennung der Zellen elektrophoretisch untersucht. Da in den ersten Expressionen die offenbar geringen Mengen der exprimierten SNO nur zu schwachen Signalen bei Verwendung von 50  $\mu$ l Mediumüberstand geführt hatten, wurden jeweils Proben mit einem Volumen von 100 bzw. 150  $\mu$ l des Mediumüberstands mit der TCA-Fällung gefällt (Kap. 2.9.2) und in der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt (Kap. 2.6.1). Die Analyse der Proben (Western-Blot, Kap. 2.9.8) ergab, dass sowohl die Proben ohne als auch mit Zusatz der Protease-Inhibitoren die rSNO innerhalb von 102 – 112 Stunden exprimieren. Die Mediumüberstände der Proben, die nach 102 h und 108 h Inkubationszeit abgenommen worden waren, wurden mit dem Qualitativen Aktivitätstest (Kap. 2.10.1) auf Aktivität geprüft. Sowohl für die Proben mit als auch ohne Protease-Inhibitoren konnte Aktivität nachgewiesen werden. Die Ausbeute der rSNO konnte bei Verwendung von Protease-Inhibitoren jedoch nicht verbessert werden (vgl. Abbildung 27). Neben der schon zuvor nachgewiesenen Proteinbande trat bei den größeren Fällungsvolumina der Mediumüberstände eine zusätzliche distinkte Bande mit schwächerem Detektionssignal auf, die erkennbar größer als die rekombinante SNO war. Diese zweite Proteinbande ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die rekombinante SNO zurückzuführen, die noch nicht sezerniert wurde und deshalb noch über die Signalsequenz verfügt. Zum Ende der Virusproduktion wurden die infizierten Insektenzellen lysiert. Hierbei gelangen auch die noch nicht sezernierten Proteine ins Medium. Zur

Entwicklung einer Expressionsmethode, mit der größere Mengen exprimierter Proteine erzielt werden sollten, wurde die rSNO in den Sf9-Zellen konstitutiv zur Expression gebracht.

### 3.5.2 Konstitutive Expression

Mit der transienten Expression durch rekombinante Baculoviren (Kap. 3.5.1) konnte die rSNO von *T. jacobaeae* in aktiver Form exprimiert werden. Die dort erzielten Mengen rekombinanten Enzyms reichte jedoch für eine biochemische Charakterisierung nicht aus. Neben den Schwierigkeiten die rekombinanten Viren quantitativ zu bestimmen war für die Expression ein großer Zeitaufwand notwendig. Mit dem InsectSelect System (Invitrogen) stand ein Expressionssystem zur Verfügung, durch welches Proteine ohne Viren zur Expression gebracht werden. Die Proteinausbeute ist deshalb nicht von Qualität und Titer einer Viruslösung oder der Infektionsdauer abhängig. Zur Etablierung einer Zelllinie, die die rSNO konstitutiv exprimiert, mußten Sf9-Zellen dafür geeignete Plasmide übertragen und deren Verbleib in den Zellen gesichert werden.

Für die konstitutive Expression wurde die Sequenz der SNO mit Signal von *T. jacobaeae* in den Vektor pIB/V5 His kloniert (Kap. 2.7.1). In einem weiteren Ansatz wurde die Sequenz mit Signal der SNO in den pIB/V5 His Vektor mit Kozak-Sequenz kloniert (Kap. 2.7.1). Laut Hersteller ist diese Translations-Initiations-Sequenz unter Umständen für eine erfolgreiche Expression des Zielgens erforderlich. Diese Konsensus-Sequenz bestimmt die Effizienz, mit der das erste AUG-Codon eukaryontischer mRNA erkannt wird. Abweichungen von dieser als Kozak-Sequenz bezeichneten Sequenz können die Translationshäufigkeit reduzieren. Beide Klonierungsprodukte wurden Liposomen-vermittelt in die Sf9-Zellen übertragen (Transfektion, Kap. 2.7.4) und zur Expression gebracht (Kap. 2.7.5).

Die bei ersten Ansätzen gewählten Selektionsbedingungen (Kap. 2.7.5) führten ausnahmslos zum Absterben aller Zellen. Deshalb wurden abweichend vom Herstellerprotokoll  $5 \cdot 10^5$  Zellen transfiziert und auf einer Wachstumsfläche von  $9,03 \text{ cm}^2$  in TC100 für 48 h inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Überstände jeweils mit 2 ml TC100 + 60 µg/ml Blastidicin ersetzt und mit diesem Selektivmedium 12 Tage inkubiert. Da unter diesen harten Selektionsbedingungen nur einzelne Klone überleben konnten und kein weiteres Zellwachstum erfolgte, wurde die Konzentration des Blastidicins innerhalb der weiteren 120 h Inkubation schrittweise von 20 µg/ml bis zur Blastidicin-freien Inkubation verringert. Das Medium wurde darüber hinaus für alle weiteren Inkubationen mit 10 % FBS ergänzt. Erst nachdem die Zellen wieder ein Wachstum zeigten, wurde die Konzentration des Blastidicins sukzessiv auf 20 µg/ml erhöht. Nach Ablauf von 21 Tagen Kulturführung wurden die Zellen für weitere 72 h in TC100 + 10 % FBS + 20 µg/ml inkubiert. Die Mediumüberstände wurden nach dieser Inkubationszeit abgenommen und über PD10 Säulen auf Standardpuffer umgepuffert und mit Zentrifugationskonzentratoren um den Faktor 25 konzentriert (Kap. 2.9.1). Aliquots dieser Konzentrate wurden mit dem Qualitativen Aktivitätstest auf Aktivität (Kap. 2.10.1) untersucht. In Proben, die von Expressionskonstrukten mit Kozak-Sequenz stammten, konnte qualitativ Aktivität nachgewiesen werden.

Jedoch konnten in weiteren Ansätzen keine größeren Mengen rekombinanten Proteins erhalten werden. Da sowohl durch die transiente als auch durch die konstitutive Expression keine größeren Mengen rekombinanter rSNO erzielt werden konnten, wurden keine weiteren Expressionen mit Insektenzellen unternommen. Für weitere Expressionsansätze wurde trotz der bekannten Nachteile das *E. coli*-System ausgewählt, da hier erfolgreich eine biochemische Charakterisierung durchgeführt werden konnte (Naumann et al., 2002).

### 3.6 Expression potentieller PNOs in *E. coli*

#### 3.6.1 Strategien zur Vermeidung von Inclusion bodies

##### 3.6.1.1 Expression der potentiellen PNO von *G. geneura*

Nach Analysen (Kap. 3.3.3 ff.) der gefundenen FMOs konnten Sequenzen identifiziert werden, die im Vergleich mit der z. B. bei *A. caja* gefundenen FMO (Kap. 3.3.3) eine größere Übereinstimmung zur SNO von *T. jacobaeae* aufwiesen. So verfügt die bei *G. geneura* identifizierte, potentielle PNO (Kap. 3.3.5) zur SNO von *T. jacobaeae* über eine Identität von 75 % auf Aminosäureebene. Im Vergleich dazu verfügt die FMO von *A. caja* (Kap. 3.3.3) nur über eine Identität von 48,4 % zur Sequenz von *T. jacobaeae*. Um zu prüfen, ob es sich bei der bei *G. geneura* identifizierten Sequenz (Kap. 3.3.5) um eine Pyrrolizidinalkloid-N-Oxygenase (PNO) handelt, sollte das dazugehörige Protein heterolog exprimiert und durch Aktivitätsbestimmungen biochemisch charakterisiert werden. Da die Expression der SNO von *T. jacobaeae* mit dem Insektenzellsystem nur unter größerem Aufwand möglich war (Kap. 3.5.1, Kap. 3.5.2), wurde für weitere Expressionen das Expressionssystem

*E. coli* ausgewählt, welches bereits für die Expression der rekombinanten SNO (rSNO) von *T. jacobaeae* eingesetzt wurde. Dort konnte trotz einiger Schwierigkeiten nach Solubilisierung und Dialyse der bei der Expression in *E. coli* aufgetretenen Proteinaggregate („Inclusion bodies“, vgl. Kap. 2.9.9) die Aktivität der rSNO bestimmt werden (Naumann et al., 2002).

Primer 41 Forward-Primer

5'-TAT ACA TAT GCA ATC TGA CCA TGC GTC TCG AGC AT – 3'

NdeI Schnittstelle

$T_m = + 68,3^\circ\text{C}$

Primer 42 Reverse-Primer

5'-TAT AGG ATC CCT AAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT CGT CAA AAG GAC

BamHI Schnittstelle codiert für 6 x Histidin

ATA TTT CCT TCC TT – 3'

$T_m = + 72,9^\circ\text{C}$

Abbildung 28: Primer zur Amplifikation der cDNA der potentiellen PNO von *G. geneura* für die Klonierung in den Expressionsvektor pET3a

Die mutmaßliche PNO wurde unter Verwendung der Expressionsprimer 41 und 42 mit der DNA-Pfx-Polymerase nach Herstellerprotokoll (Invitrogen) amplifiziert. Der Forward-Primer wurde so konstruiert, dass die potentielle N-terminale, eukaryontische Signalsequenz (Kap. 3.3.5) nicht Teil des Expressions-Konstruktes war. Durch den Reverse-Primer wurde ein Affinitätstag (HIS-Tag) eingefügt, der die Reinigung mit einer Affinitätschromatographie ermöglichen sollte (Kap. 2.9.11). Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den Vektor pET3a kloniert (Kap. 2.6.7). Nach Vermehrung in *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde das Expressions-Konstrukt in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert und nach Restriktionskontrolle (Kap. 2.6.6) ein Klon für die Expression ausgewählt. Dieser wurde für praktisch alle weiteren Expressionsversuche eingesetzt. Die Expression erfolgte wie in Kap. 2.8.1 beschrieben.

# TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION DER POTENTIELLEN PNO-CODIERENDEN SEQUENZ VON *G. GENEURA*

+ 95°C	5 min	} 35 Zyklen
+ 95°C	45 sec	
+ 60°C	90 sec	
+ 72°C	3 min	
+ 72°C	10 min	
+ 15°C	∞	

Da die rSNO von *T. jacobaeae* in *E. coli* ausschließlich unter Bildung von Inclusion bodies exprimiert werden konnte (Naumann, 2003), sollte deshalb in einem ersten Schritt an verschiedenen Parametern untersucht werden, ob die Bildung der Inclusion bodies vermieden oder zumindest verringert werden konnte.

Um zu prüfen, ob bei Expression der potentiellen PNO von *G. geneura* mit einer geringeren Expressionsrate zumindest eine Teilmenge der exprimierten Proteine in der richtigen Konformation vorlagen, wurden die Expressionsbedingungen hinsichtlich Induktor-Konzentration und Temperatur variiert. Nach ersten Expressionen (Kap. 2.8.1) wurde die Konzentration des Induktors IPTG von 0,4 mM (Naumann, 2003) auf 0,04 mM reduziert, ohne dass die Bildung von Inclusion bodies vermindert oder vermieden werden konnte. Da keine Nachteile erkennbar waren, erfolgten alle weiteren Induktionen bei einer IPTG-Konzentration von 0,04 mM. In weiteren Expressionen wurde geprüft, ob durch Variation der Inkubationstemperatur die Bildung von Inclusion bodies verringert werden konnte. Hierfür wurden die Inkubationstemperaturen +26°C, +18°C und +4°C ausgewählt. Die Induktionsansätze wurden über Nacht bei +26°C bzw. +18°C und bei +4°C für 72 h inkubiert. Nach Aufschluss der induzierten Zellen mit Ultraschall (Kap. 2.8.4) wurden die Inclusion bodies isoliert und solubilisiert (Kap. 2.9.9). Proben der Aufarbeitungsstufen wurden elektrophoretisch getrennt (Kap. 2.9.4) und mit der Coomassie-Färbung detektiert (Kap. 2.9.5). Bei den untersuchten Proben der drei Inkubationstemperaturen traten ausnahmslos Inclusion bodies auf. Da durch eine von +26°C abweichende Inkubationstemperatur keine Vorteile erkennbar waren wurde für alle weiteren Expressionen die Inkubationstemperatur auf +26°C und die Inkubationszeit auf ca. 18 h festgelegt.

Neben den physikalischen Bedingungen kann das für die Expression eingesetzte Medium Einfluss auf den Expressionsorganismus ausüben. Um zu prüfen, ob durch einen veränderten pH-Wert zumindest zum Teil das exprimierte Protein in aktiver Form erhalten werden konnte, wurden von einer LB-Charge (pH-Wert LB-Medium 7,6) Teilmengen abgenommen und auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt. Eine Vorkultur des Expressionsklons wurden unter Standardbedingungen angezogen und dann in LB-Medien mit den pH-Werten 7,0, 7,6, 8,0 und 8,5 zur Expression gebracht. Nach Aufschluss der induzierten Zellen und Zentrifugation der erhaltenen Aufschlüsse wurden Proben der Aufarbeitungsstufen elektrophoretisch untersucht. Das induzierte Protein wurde jedoch in allen Fällen im unlöslichen Rückstand wiedergefunden. Die Bildung von Proteinaggregaten konnte also auch nicht durch Expression bei anderen pH-Werten vermieden werden. Der pH-Wert des LB-Mediums von ca. 7,6 wurde deshalb bei weiteren Expressionen beibehalten.

In einem weiteren Ansatz zur Vermeidung von Proteinaggregaten wurde untersucht, ob der Zell-Aufschluss durch Ultraschall (Kap. 2.8.4) für die Denaturierung der exprimierten Proteine und

somit für die Bildung von Proteinaggregaten verantwortlich sein konnte. Hierfür wurde die Expression der potentiellen PNO von *G. geneura* unter Standardbedingungen (s. o. und Kap. 2.8.1) durchgeführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte jedoch alternativ mit der French® Pressure Cell (Fa. Polytec), mit der die Expressionsorganismen durch Druckentspannung aufgeschlossen wurden. Neben dem vom Hersteller empfohlenen Druck von 1000 psi für den Zellaufschluss wurden zwei weitere Teilmengen eines Expressionsansatzes mit einem Druck von 750 bzw. 1250 psi aufgeschlossen (Abbildung 29).

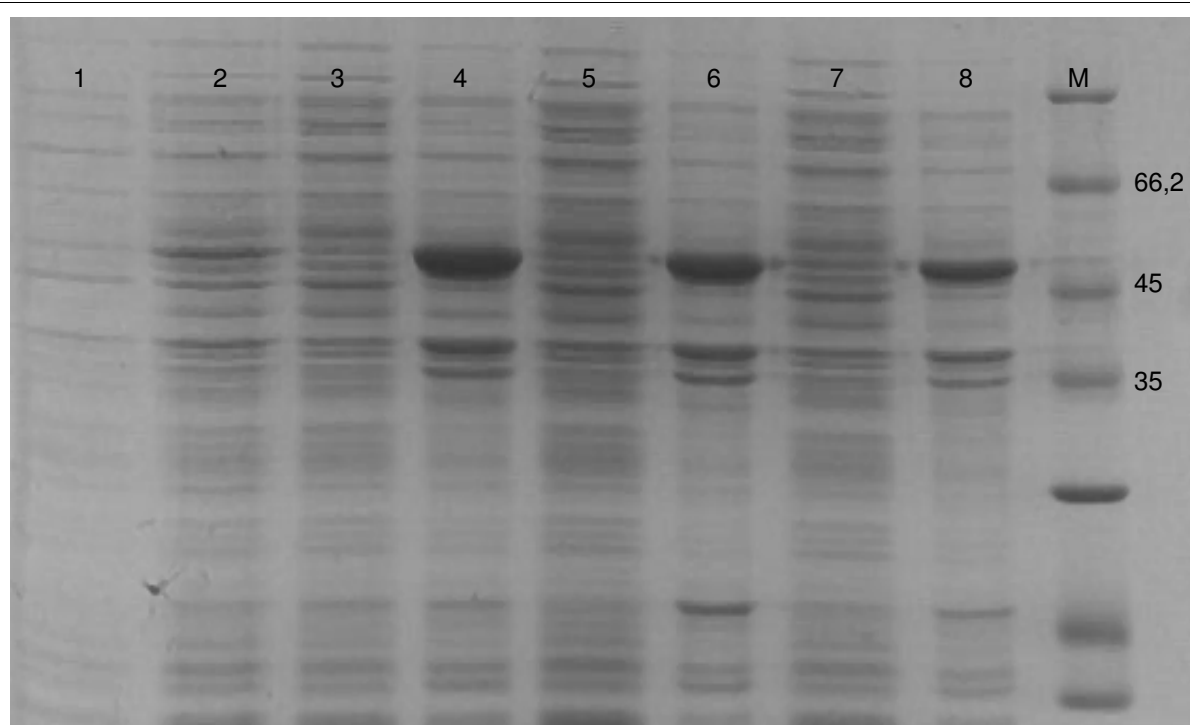


Abbildung 29: Verschiedene Aufschluss-Bedingungen (French Press) eines Expressionsansatzes der potentiellen PNO von *G. geneura*. Coomassie gefärbtes SDS-Gel (Kap. 2.9.4 und 2.9.5). Die Lösungen der induzierten Zellen wurden mit der French Pressure Cell nach Herstellerprotokoll (Polytec) aufgeschlossen und danach zentrifugiert. Die unlöslichen Rückstände wurden in 200 µl Puffer suspendiert. 1 *E. coli* Zellen vor Induktion mit IPTG (30 µl). 2 *E. coli* Zellen nach Induktion mit IPTG (8 µl). 3 Zellaufschluss mit 750 psi. Löslicher Überstand (10 µl). 4 Zellaufschluss mit 750 psi. Suspension unlöslicher Rückstand (4 µl). 5 Zellaufschluss mit 1000 psi. Löslicher Überstand (10 µl). 6 Zellaufschluss mit 1000 psi. Suspension unlöslicher Rückstand (4 µl). 7 Zellaufschluss mit 1250 psi. Löslicher Überstand (10 µl). 8 Zellaufschluss mit 1250 psi. Suspension unlöslicher Rückstand (4 µl) M Proteinleiter [kDa].

Nach Induktion mit IPTG konnte in den transformierten *E. coli*-Zellen ein ca. 50 kDa großes Protein exprimiert werden (Abbildung 29, Probe 2). Dieses trat bei allen untersuchten Aufschluss-Bedingungen nach Zentrifugation der Zellaufschlüsse im unlöslichen Rückstand auf (Proben 4, 6 und 8). Die korrespondierenden Überstände (Proben 3, 5 und 7) ließen eine Reihe von Proteinen in dem Größenbereich von ca. 50 kDa erkennen. Um zu prüfen, ob in dem löslichen Überstand die potentielle bzw. aktive rekombinante PNO (rPNO) von *G. geneura* wenigstens in geringen Mengen vorlag, wurden die löslichen Überstände über PD10-Säulen auf den 10 mM Kaliumphosphatpuffer (Standardpuffer, Kap. 2.10.1, Lindigkeit 1996) umgepuffert und mit Zentrifugationskonzentratoren 15-fach konzentriert (Kap. 2.9.1). Zum Nachweis der *N*-Oxygenaseaktivität wurden die Konzentrate mit dem qualitativen Aktivitätstest geprüft (Kap. 2.10.1). In keiner der untersuchten Proben konnte

Aktivität nachgewiesen werden. Deshalb erfolgten alle weiteren Aufschlüsse induzierter *E. coli*-Zellen mit dem schnelleren und einfacheren Ultraschall-Verfahren (Kap. 2.8.4).

Da die zuvor getesteten Variationen der Expressions- und Aufschluss-Bedingungen die Bildung von Inclusion Bodies nicht verhindern konnten, sollte in weiteren Expressionen geprüft werden (Kap. 3.6.1.3), ob durch die zeitgleiche Expression von faltungsunterstützenden Proteinen (Chaperonen) zumindest Teilmengen der heterolog exprimierten, potentiellen PNOs in aktiver Form erhalten werden konnten.

### 3.6.1.2 Expression der potentiellen PNO von *A. caja*

Bisherige Versuche die rPNO von *G. geneura* in einer aktiven Konformation zu erhalten, führten in fast allen Fällen zur Bildung von Inclusion Bodies (Kap. 3.6.1 ff.), die erst wieder nach Solubilisierung (Kap. 2.9.9) in eine aktive Konformation gefaltet werden mussten (Kap. 3.6.2). Die Bildung von Inclusion Bodies kann in einigen Fällen offenbar beeinflusst werden durch die Auswahl von Vektor und Expressionsstamm (Lange, 2004). Aus diesem Grund wurde für die Expression der rSNO von *A. caja* als Expressionsvektor der pQE60-Vektor ausgewählt (Qiagen, Kap. 2.3). Dieser verfügt neben einem C-terminalen HIS-Tag über das T5-RNA-Polymerase/Promotorsystem, welches durch das Lac-Repressorprotein spezifisch regulierbar ist. Für die Expression wurde der *E. coli*-Stamm M15 pREP4 (Kap. 2.5.2) eingesetzt, der bereits mit dem pREP4-Plasmid (Kap. 2.3) vortransformiert war. Das pREP4-Plasmid codiert für eine Kanamycinresistenz und für das Lac-Repressorprotein, welches durch kontinuierliche Expression die Transkription des Zielproteins unterdrückt. Erst die Zugabe von IPTG hemmt das Repressorprotein in seiner Funktion und ermöglicht so die gezielte Expression des rekombinanten Proteins.

#### TEMPERATURPROGRAMM ZUR AMPLIFIKATION DER cDNA DER POTENTIELLEN PNO VON *A. CAJA*

+ 94°C	5 min	} 35 Zyklen
+ 94°C	45 sec	
+ 60°C	1 min	
+ 68°C	4 min	
+ 68°C	10 min	
15°C	∞	

Für die Klonierung der potentiellen PNO von *A. caja* wurde Gesamt-RNA aus dem Fettkörper isoliert (Kap. 2.6.2) und in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.6.3). Abweichend von Kap. 2.6.4 wurde die potentielle PNO von *A. caja* mit den Primern 43 und 44 (Abbildung 30) mit der Pfx-DNA-Polymerase nach Herstellerprotokoll (Invitrogen) amplifiziert. Die erhaltene PCR-Lösung wurde mit dem NucleoSpin Extract Kit nach Herstellerprotokoll (Macherey-Nagel) gereinigt und in den mit den Restriktionsenzymen Nco I und Bgl II linearisierten Vektor (Kap. 2.6.6) pQE60 ligiert (Kap. 2.6.7). Die erhaltenen Ligationsansätze wurden für die Transformation (Kap. 2.6.9) des *E. coli* Stammes M15 pREP4 eingesetzt.



## Primer43 Forward-Primer

5'- TAT CCA TGG GTC AAT CTA GCC CAA CGT CTC GAG TAT G - 3'  
 Nco I Schnittstelle  $T_m = + 71,1^\circ\text{C}$

## Primer44 Reverse-Primer

5'- TAT AGA TCT GTC GTC AAA AGG ACA TAT TTC TTT ACT TG - 3'  
 Bgl II Schnittstelle  $T_m = + 65,1^\circ\text{C}$

Abbildung 30: Primer zur Amplifikation der cDNA der potentiellen PNO von *Arctia caja* für die Klonierung in den Expressionsvektor pQE60

Von den erhaltenen transformierten *E. coli*-Klonen wurde nach Restriktionsanalyse (Kap. 2.6.6) mit den Restriktionsenzymen Nco I und Bgl II ein Klon für die Expression ausgewählt. Die Expression der rPNO von *A. caja* erfolgte wie in Kap. 2.8.1 beschrieben. Die induzierten *E. coli*-Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugation in löslichen Überstand und Rückstand getrennt (Kap. 2.8.4). Proben der Aufarbeitung wurden elektrophoretisch untersucht (Kap. 2.9.4). Die Expression der potentiellen PNO von *A. caja* führte jedoch auch bei Verwendung eines anderen Expressionsvektors bzw. Expressions-Stammes zu unlöslichen Proteinaggregaten.

Da auch die zuvor bei *G. geneura* (Kap. 3.6.1.1) bereits getesteten Variationen der Expressions- und Aufschluss-Bedingungen die Bildung von Inclusion Bodies nicht verhindern konnten, sollte in weiteren Expressionen geprüft werden (Kap. 3.6.1.3), ob durch die zeitgleiche Expression von faltungsunterstützenden Proteinen (Chaperonen) zumindest Teilmengen der heterolog exprimierten, potentiellen PNOs in aktiver Form erhalten werden konnten.

### 3.6.1.3 Coexpression der potentiellen PNO von *G. geneura* und *A. caja* mit Chaperonen

Für die richtige Konformation von nativen Proteinen stehen sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten eine Reihe von faltungsunterstützenden Proteinen, sogenannten Chaperonen, zur Verfügung, die konstitutiv oder nach Induktion gebildet werden. So werden einige Chaperone nach Erwärmen von Zellen gebildet, um bei Proteinen, die durch Wärmeeinwirkung in eine nicht native Konformation überführt wurden, die Wiederherstellung der richtigen Konformation zu unterstützen (Dalbey und Heijne, 2002). Die nach Einwirkung von Wärmeenergie induzierten Chaperone werden auch als Hitzeschockproteine bezeichnet. Chaperone übernehmen bei der Proteinexpression in prokaryontischen bzw. eukaryontischen Zellen wichtige Funktionen im Dirigieren und Falten von Proteinen. Hierbei arbeiten durchaus mehrere Chaperonproteine zusammen, die in Funktionseinheiten gegliedert sind (Dalbey und Heijne, 2002). Um zu prüfen, ob durch die parallele Expression von Chaperonen und der potentiellen PNO von *G. geneura* diese in aktiver Form erhalten werden konnte, wurden von den zur Auswahl stehenden bekannten Chaperonen zwei Gruppen von bakteriellen Chaperonen ausgewählt, durch die bereits rekombinante Proteine aktiv exprimiert werden konnten (Caspers, 1994).

Für die erste Coexpression wurde der *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE) (Kap. 2.5.2) eingesetzt, der bereits mit dem Vektor pREP4-groESL vortransformiert war (Kap. 2.3). Dieser vermittelt eine Kanamycinresistenz und weist die genetische Information für die HSP60-Chaperone GroEL und GroES auf. Für die Expression wurde dieser Expressionsstamm noch zusätzlich mit dem Vektor-Konstrukt für die potentielle PNO von *G. geneura* (Kap. 3.6.1) transformiert. Durch diesen Vektor wurde zudem eine Ampicillinresistenz vermittelt, so dass bei Einsatz beider Antibiotika die Zellen selektiert wurden, die beide Vektoren aufgenommen hatten. Die Expression erfolgte wie in Kapitel

2.8.1 beschrieben. Um zu prüfen, ob durch die Coexpression ein Anteil der potentiellen PNO in löslicher Form erzielt werden konnte, wurde der lösliche Überstand durch Affinitätschromatographie gereinigt (2.9.11). Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden vereint und mit dem Zentrifugationskonzentrator (Kap. 2.9.1) aufkonzentriert (8-fach). Proben der Aufarbeitungsstufen wurden elektrophoretisch getrennt (SDS-PAGE, Kap. 2.9.4) und mit der Coomassie-Färbung detektiert (3.6.1.3).

Nach Induktion wurden von den *E. coli*-Zellen deutlich drei Proteine exprimiert (Abbildung 31). Eines der Proteine weist eine Größe von ca. 50 kDa auf und entsprach somit der vorhergesagten Molekularmasse für die potentielle rPNO von *G. geneura* (Kap. 3.3.5). Die beiden Chaperonproteine haben eine Größe von ca. 60 bzw. 16 kDa. Nach Zentrifugation des Zellaufschlusses befanden sich die ca. 16 bzw. 60 kDa großen Proteine, die sich durch die Zugabe von IPTG induzieren ließen (Abbildung 31, Probe 2), im löslichen Überstand (Probe 3). Das durch Zugabe von IPTG induzierte 50 kDa Protein, welches der vorhergesagten Molekularmasse für die rPNO von *G. geneura* entsprach, konnte nach Zentrifugation des Zellaufschlusses nicht mehr im löslichen Überstand identifiziert werden (Probe 2 bzw. 4). In der Probe der Elutionsfraktionen konnte kein Protein nachgewiesen werden (Probe 8). Durch die Coexpression mit den HSP60-Chaperonen ließ sich somit bei den untersuchten Bedingungen keine lösliche rPNO erzeugen.

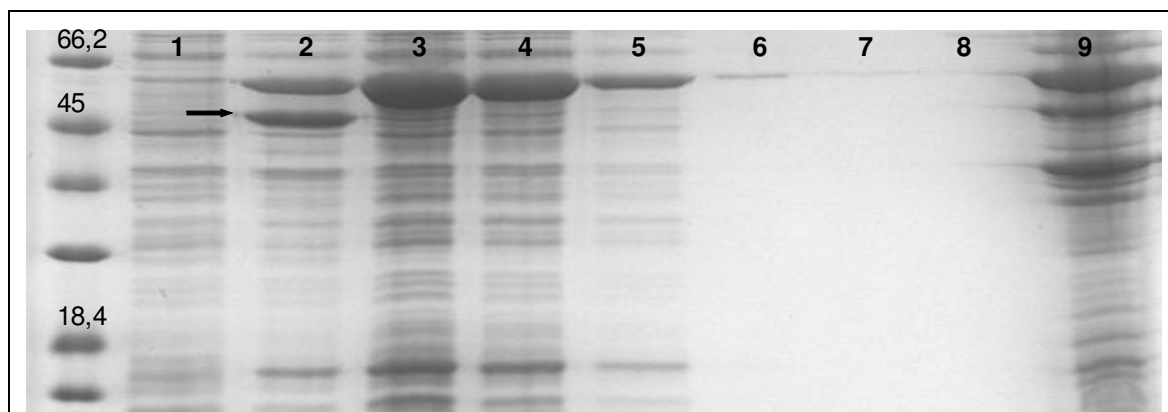


Abbildung 31: Coexpression der potentiellen PNO von *G. geneura* mit den HSP60-Chaperonen GroES und GroES.

M Proteinleiter [kDa]. 1 *E. coli*-Zellen vor Induktion mit IPTG (50 µl). 2 *E. coli*-Zellen nach Induktion mit IPTG (8 µl). Das induzierte, ca. 50 kDa große Protein, die potentielle rekombinante PNO von *G. geneura*, ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. 3 Löslicher Überstand des Zellaufschlusses. 4 Probelösung nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose (8 µl). 5 Erste Waschlösung der Ni-NTA-Agarose (10 µl). 6 Zweite Waschlösung (10 µl). 7. Dritte Waschlösung (10 µl). 8. Vereinte Elutionsfraktionen (10 µl). 9. Unlöslicher Rückstand nach Zellaufschluss.

Weitere Coexpressionsversuche erfolgten deshalb mit dem Vektor pRDKJG (Kap. 2.3), der die genetische Information für die HSP70-Chaperone DanK, DnaJ und GrpE enthielt. Der *E. coli* Stamm BL21 (DE), der bereits mit dem Vektor pRDKJG vortransformiert war, wurde mit dem Vektor-Konstrukt für die potentielle PNO von *G. geneura* (Kap. 3.6.1) bzw. für die potentielle PNO von *A. caya* (Kap. 3.6.1.2) transformiert und zur Expression gebracht (Kap. 2.8.1). Die induzierten Zellen wurden wie zuvor mit Ultraschall aufgeschlossen (Kap. 2.8.4).

Bei der Expression der potentiellen PNO von *G. geneura* konnte neben den drei Chaperonen auch ein ca. 50 kDa großes Protein exprimiert werden (Abbildung 32, Probe 2), welches den für die potentielle rPNO gemachten Vorhersagen entsprach (Kap. 3.3.5). Dieses Protein konnte nach dem Aufschluss der Zellen auch im löslichen Überstand wiedergefunden werden (Probe 4).

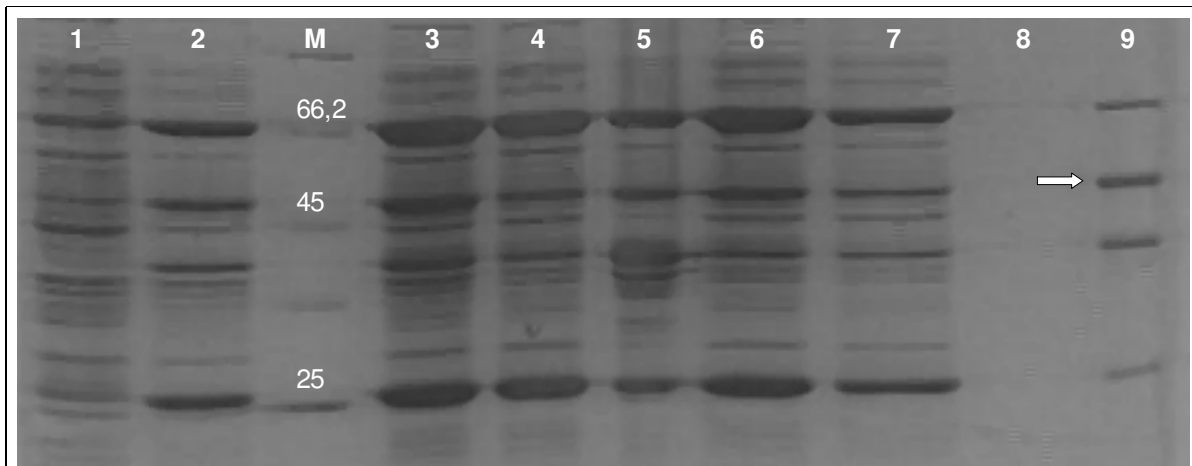
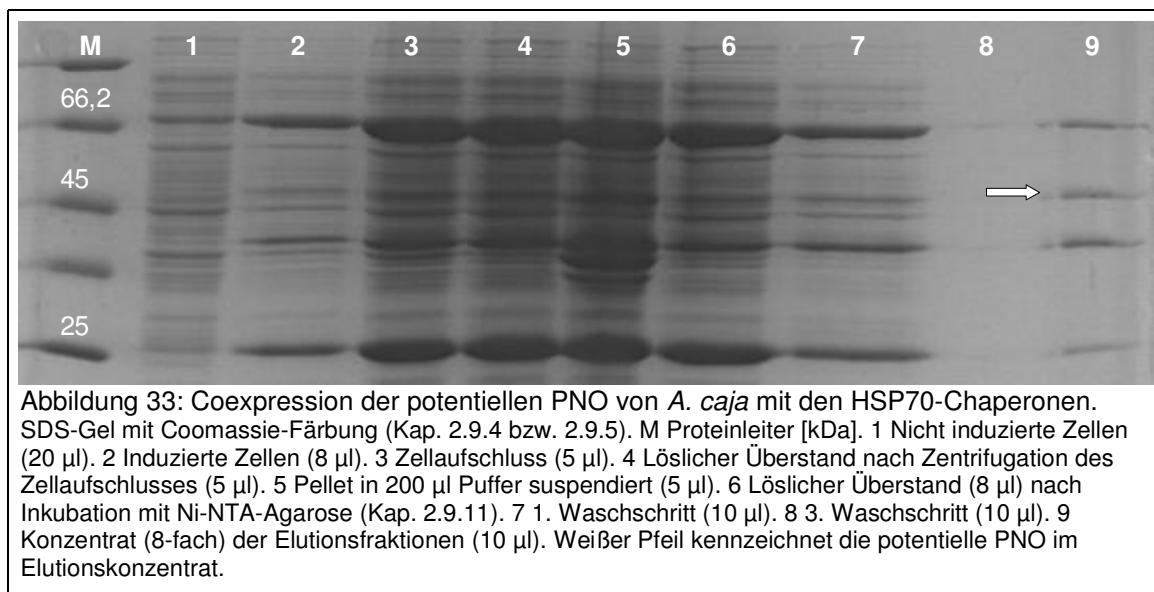


Abbildung 32: Coexpression der potentiellen PNO von *G. geneura* mit den HSP70-Chaperonen. SDS-Gel mit Coomassie-Färbung (Kap. 2.9.4 bzw. 2.9.5). 1 Nicht induzierte Zellen (40  $\mu$ l). 2 Induzierte Zellen (8  $\mu$ l). M Proteinleiter [kDa]. 3 Zellaufschluss (5  $\mu$ l). 4 Löslicher Überstand nach Zentrifugation des Zellaufschlusses (5  $\mu$ l). 5 Pellet in 200  $\mu$ l Puffer suspendiert (5  $\mu$ l). 6 Löslicher Überstand (8  $\mu$ l) nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose (Kap. 2.9.11). 7 1. Waschschrift (10  $\mu$ l). 8 3. Waschschrift (10  $\mu$ l). 9 Konzentrat (8-fach) der Elutionsfraktionen (10  $\mu$ l). Weißer Pfeil kennzeichnet die potentielle PNO im Elutionskonzentrat.

Der nach Zentrifugation des Zellaufschlusses erhaltene lösliche Überstand wurde deshalb auf Bindungspuffer umgepuffert (Kap. 2.9.1) und mit der Affinitätschromatographie gereinigt (Kap. 2.9.11). Die Elutionsfraktionen wurden vereint und mit Zentrifugationskonzentratoren (Kap. 2.9.1) auf den 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH= 7,0, Kap. 2.10.1) umgepuffert. Proben der Aufarbeitungsstufen wurden mit der SDS-PAGE (Kap. 2.9.4) untersucht. Die vier induzierten Proteine traten in praktisch allen Aufarbeitungsstufen bis hin zu den Elutionsfraktionen gemeinsam auf (Abbildung 32). Auffällig bei der Coexpression der potentiellen rPNO von *G. geneura* mit den HSP70-Chaperonen war, dass erstmalig das ca. 50 kDa große Protein, welches der vorhergesagten Größe für die potentielle rPNO entsprach, im löslichen Überstand gefunden werden konnte (Abbildung 32, Probe 4). Um zu prüfen, ob es sich um die gesuchte, erstmalig lösliche rPNO in aktiver Form handelte, wurde das eluierte Proteingemisch mit dem qualitativen Aktivitätstest geprüft (Kap. 2.10.1). Eine Aktivität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob für die potentielle PNO von *G. geneura* eine Aktivität bei veränderten Pufferbedingungen nachweisbar war, wurde die Coexpression und Reinigung wie zuvor wiederholt und die erhaltenen Elutionsfraktionen in einem 10 mM Kaliumphosphat-Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 auf Aktivität geprüft (Kap. 2.10.1). Sowohl bei diesen, als auch bei Proben, die zusätzlich noch 200  $\mu$ M FAD enthielten, konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

Parallel zur Expression der potentiellen PNO von *G. geneura* wurde die potentielle PNO von *A. caja* exprimiert und gereinigt (s. o.). Proben der Aufarbeitungsstufen wurden mit der SDS-PAGE untersucht (Abbildung 33). Auch bei der Expression der potentiellen PNO von *A. caja* konnten die drei Chaperone exprimiert werden, die sowohl im löslichen Überstand als auch im Pellet auftraten (Abbildung 33, Probe 2, 4 und 5). Eine der potentiellen PNO von *A. caja* (Kap. 3.3.7) entsprechende Proteinbande von ca. 50 kDa konnte jedoch erst in dem Konzentrat der Elutionsfraktionen erkannt werden (Abbildung 33, Probe 9). Das auf den 10 mM Kaliumphosphat-Puffer (s. o.) umgepufferte Elutionskonzentrat wurde mit dem Qualitativen Aktivitätstest (Kap. 2.10.1) geprüft. Eine Aktivität konnte jedoch auch für die potentielle PNO von *A. caja* nicht nachgewiesen werden.



Da auch bei gemeinsamer Expression die potentielle rPNO nicht in aktiver Form erhalten werden konnte, zielten weitere Versuche darauf ab, die Solubilisierung und nachfolgende Renaturierung der Inclusion bodies zu optimieren.

### 3.6.2 Renaturierung der PNO von *G. geneura* aus Inclusion bodies

Die Expression der potentiellen PNO von *G. geneura* nach Kap. 2.8.1 führte ausnahmslos zur Bildung von Proteinaggregaten bzw. Einschlusskörpern („Inclusion bodies“, vgl. 2.9.9), die weder löslich noch aktiv waren (Kap. 3.6.1). Neben diesen Nachteilen konnten diese Proteinaggregationen jedoch relativ einfach isoliert werden (Kap. 2.9.9). Darüber hinaus können die bei Expressionen gebildeten Inclusion bodies nach Solubilisierung durch Dialyse zum Teil erfolgreich renaturiert werden (Lilie et al., 1998, Lange und Rudolph, 2004). Zu Beginn dieser Untersuchungen lagen Ergebnisse zur Solubilisierung und Dialyse von Inclusion bodies der rSNO von *T. jacobaeae* im *E. coli*-System vor, die nur mit schlechter Reproduzierbarkeit aktives Protein lieferten (Naumann, 2003). Die Bestimmung der Aktivität konnte auch nur in einem Dialysepuffer mit basischem pH-Wert (pH= 8,5) ermittelt werden, da die rekombinante SNO bei dem für die native SNO von *T. jacobaeae* ermitteltem pH-Optimum von pH= 7,0 (Lindigkeit, 1996) nicht stabil löslich war. Für die Expression weiterer Flavin-abhängiger Monooxygenasen sollten verschiedene Renaturierungsverfahren getestet werden, um Enzyme mit möglichst hoher spezifischer Aktivität durch ein reproduzierbares Verfahren erhalten zu können. Die hierfür erforderlichen Expressionen wurden einheitlich nach dem in Kap. 2.8.1 beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Das Vektor-Konstrukt für die potentielle PNO von *G. geneura* (Kap. 3.6.1.1) wurde zur Expression gebracht (Kap. 2.8.1), die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen (Kap. 2.8.4) und das sich in den Inclusion bodies befindliche ca. 50 kDa große Protein der potentiellen PNO solubilisiert (Kap. 2.9.9). In Anlehnung an das bereits mit einigem Erfolg angewandte Renaturierungsverfahren (Naumann, 2003) wurden die solubilisierten Inclusion bodies einem zweistufigen Renaturierungsverfahren unterworfen. Bevor die solubilisierten, rekombinanten Proteine den eigentlichen Dialysebedingungen ausgesetzt wurden, wurde die denaturierende Solubilisierungslösung durch sukzessiven Austausch der Dialyselösung entfernt. Hierfür wurden die

solubilisierten Proteine in einen Dialyseschlauch überführt, der dann zur Dialyse in 20 mM Tris-Puffer pH= 8,5 mit 0,1 mM DTT eingebracht wurde. Nach 49 h Stunden wurde das Puffergemisch kurzfristig für 6 h durch einen 20 mM Tris-Puffer (pH= 8,5) ausgetauscht, um letzte Reste der ersten Dialyselösung zu entfernen. Im zweiten Dialyseschritt wurden dem 10 mM Tris-Puffer Reagenzien hinzugefügt, die die Ausbildung der richtigen Konformation unterstützen sollten. So können Proteine, deren Raumstruktur maßgeblich von der richtigen Verknüpfung der Disulfidbrücken abhängt, durch Redoxreaktionen über verschiedene Zwischenstufen in Form von Gleichgewichtsreaktionen gefaltet werden. Für die Ausbildung der korrekten Faltung wurde deshalb dem Puffer das Redoxpaar aus reduziertem und oxidiertem L-Glutathion und FAD als Cofaktor der Flavin-abhängigen Monooxygenasen hinzugefügt. Für die Dialyse wurde deshalb dem 20 mM Tris-Puffer 1 mM reduziertes Glutathion, 0,2 mM oxidiertes Glutathion und 0,2 mM FAD hinzugefügt. Nach 110 h Dialyse wurde die Probelösung mit dem Zentrifugationskonzentrator (Kap. 2.9.1) auf den 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH=7,0 (1 mM DTT) umgepuffert und dabei 1:10 konzentriert. Das Konzentrat wurde mit radioaktivem Substrat auf Aktivität geprüft (Kap. 2.10.1). Eine *N*-Oxygenierung des tertiären Senecionins konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung von Dialysebedingungen, unter denen die potentiellen PNO von *G. geneura* in aktiver Form erhalten werden konnte, wurde das Expressions-Konstrukt erneut zur Expression gebracht und wie zuvor isoliert. In Anlehnung an die bereits verwendeten Dialysebedingungen wurde der 20 mM Tris-Puffer (pH= 8,5) und die potentiell faltungsunterstützenden Reagenzien erneut eingesetzt (Faltungsprotokoll I, Abbildung 2, S. 45). Um zu prüfen, ob durch Zusatz von DTT, durch das geknüpfte Disulfidbrücken wieder gelöst bzw. Proteine vor Oxidationsreaktionen geschützt werden können, die potentielle PNO von *G. geneura* in aktiver Form erhalten werden konnte, wurde einem Vergleichsansatz 1 mM DTT hinzugefügt (Faltungsprotokoll II, Abbildung 2). Nach einer Dialysezeit von 120 h konnte nur bei den nach Faltungsprotokoll I dialysierten Proben im 10 mM Kaliumphosphatpuffer qualitativ eine Senecionin-*N*-Oxygenase-Aktivität nachgewiesen werden (Kap. 2.10.1). Da bei dem qualitativen Aktivitätstest kein vollständiger Umsatz des Senecionins detektiert werden konnte, wurde die Dialyse bei der aktiven Probe nach Faltungsprotokoll I für 454 h fortgeführt. Danach wurden die Dialysate auf den Bindungspuffer für die Affinitätschromatographie mit PD10-Säulen umgepuffert (Kap. 2.9.1) und wie unter Kap. 2.9.1.1 beschrieben gereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden mit dem Zentrifugationskonzentrator auf den 10 mM Kaliumphosphatpuffer umgepuffert, mit dem qualitativen Aktivitätstest und dem radioaktiven Unterfütterungstest (Kap. 2.10.3) auf Aktivität geprüft. Für die potentielle PNO von *G. geneura* konnte in beiden Testverfahren eine *N*-oxygenierende Aktivität bei dem tertiären PA Senecionin nachgewiesen werden. Nach den Ergebnissen des radioaktiven Unterfütterungstestes (Kap. 2.10.3) konnte für die potentielle PNO von *G. geneura* eine spezifische Aktivität von 1,9 nkat/mg bestimmt werden.

In einer erneuten Expression wurde geprüft, ob der in dem Faltungsprotokoll I (Abbildung 2, S. 45) durchgeführte Schritt 1 zum Entfernen von Solubilisierungsbestandteilen notwendig ist. Die solubilisierten Inclusion bodies wurden deshalb direkt in den Faltungspuffer eingebracht (Kap. 2.9.10, Nicht sukzessive Dialyse). Dieser entsprach dem Puffer 2 des Faltungsprotokolls I. Nach einer Gesamt-Dialysezeit von 260 h wurde das Dialysat mit dem Zentrifugationskonzentrator auf den 10 mM Kaliumphosphatpuffer umgepuffert. Eine Aktivität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der spezifischen Aktivität wurde die Expression bzw. die Dialyse nach Faltungsprotokoll I wiederholt. Die Renaturierung zumindest einer Teilmenge des rekombinanten Proteins, die zuvor durch die spezifische *N*-Oxygenierung von radioaktivem Senecion belegt worden war, konnte jedoch nicht reproduziert werden.

Da durch die zuvor verwendeten Dialyseprotokolle weder eine die Faltung hemmende noch eine die Faltung unterstützende Wirkung belegt werden konnte, sollte nach weiteren Renaturierungsversuchen geprüft werden, ob durch ein DTT-freies Intervall von 2 bzw. 30 h während der Dialyse (Faltungsprotokolle III und IV, Abbildung 2, S. 45) aktive Proteine erhalten werden konnten. Abweichend von Faltungsprotokoll III wurde nach 190 h Dialyse mit Faltungspuffer 2 die FAD-Konzentration auf 0,1 mM gesenkt. Für die Proben, die nach dem Faltungsprotokoll III renaturiert wurden, konnte mit dem Qualitativen Aktivitätstest (Kap. 2.10.1) Aktivität im Faltungspuffer (pH= 8,5) nachgewiesen werden. Da offenbar trotz der verringerten FAD-Konzentration aktives Protein erhalten werden konnte, wurde dieser Puffer auch für die weitere Dialyse verwendet. Im Vergleich hierzu konnte bei den Proben, die nach dem Faltungsprotokoll IV dialysiert wurden, keine Aktivität nachgewiesen werden. Nach einer Gesamt-Dialysezeit von 387 h mit Faltungspuffer 2 wurde die Probe, die nach dem Faltungsprotokoll III dialysiert wurde, auf den Bindungspuffer umgepuffert und über Affinitätschromatographie gereinigt (Kap. 2.9.11). Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurden vereint und auf den 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH=7,0) umgepuffert. Die Aktivität wurde dann mit dem qualitativen Aktivitätstest (Kap. 2.10.1) und quantitativ mit dem radioaktiven Unterfütterungstest (Kap. 2.10.3) bestimmt. Mit den Ergebnissen des radioaktiven Unterfütterungstest konnte die spezifische Aktivität für das Substrat Senecion mit 4,6 nkat/mg bestimmt werden.

Bei den durchgeführten Renaturierungen der Inclusion bodies bestätigte sich die bei *T. jacobaeae* bereits gemachte Erfahrung, dass die rekombinanten Proteine durch die verwendeten Verfahren nicht reproduzierbar aktiv erhalten werden konnten. Dabei indizieren die gemessenen spezifischen Aktivitäten, dass nur eine Teilmenge der rekombinanten PNO renaturiert werden konnte. Dies steht in Übereinstimmung zu den Aktivitäten, die nach Renaturieren von Inclusion bodies der rekombinanten SNO von *T. jacobaeae* gemessen werden konnten. Die spezifische Aktivität der rSNO von *T. jacobaeae* konnte durch Variation von Renaturierungsverfahren auf bis zu 2,7 nkat/mg gesteigert werden (Naumann, 2003). Hierzu im Gegensatz wurde die spezifische Aktivität für die gereinigte, native SNO von *T. jacobaeae* mit 77,6 nkat/mg bestimmt (Lindigkeit, 1996).

Für das nach unterschiedlichen Verfahren renaturierte Enzym, welches bereits durch die Identitätsübereinstimmung zur SNO von *T. jacobaeae* als potentielle PNO in Betracht gezogen wurde (Kap. 3.3.5), konnte wiederholt eine N-oxxygenierende Aktivität mit dem tertiären Pyrrolizidinalkaloid Senecionin als Substrat nachgewiesen werden. Durch den Nachweis einer spezifischen Aktivität für die molekularbiologisch isolierte Flavin-abhängige Monooxygenase aus *G. geneura* (Kap. 3.3.5), konnte somit belegt werden, dass es sich hierbei um eine der gesuchten Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxygenasen handelt.

### 3.7 Gewebespezifische Expression der potentiellen PNO von *A. caja*

Die *N*-Oxygenierung tertiärer PAs konnte bei verschiedenen Arctiiden in Proben der Hämolymphe nachgewiesen werden (Lindigkeit 1996; Kap. 3.1.1 und 3.1.2). Nach Identifizierung der cDNA der SNO von *T. jacobaeae* konnte eine N-terminale Signalsequenz prognostiziert werden, die die SNO für den vesikulären Transport adressiert (Naumann, 2003). Für diese SNO konnte der extrazelluläre Transport durch Expressionsversuche bestätigt werden (Naumann, 2003, Kap. 3.5.1). Nach Untersuchung der gewebespezifischen Expression konnte für die SNO von *T. jacobaeae* der Fettkörper als bevorzugtes Expressionsgewebe identifiziert werden (Naumann, 2003). Um zu prüfen, ob der Fettkörper auch bei anderen Arctiiden das bevorzugte Expressionsgewebe für die (potentiellen) PNOs ist, sollte der Generalist *A. caja* untersucht werden. Für *A. caja* war eine *N*-Oxygenierung von tertiären PAs in Hämolympheproben bereits nachgewiesen (Lindigkeit, 1996). Nach Identifizierung der cDNA konnte mit SignalP auch für die potentielle PNO von *A. caja* eine N-terminale Signalsequenz prognostiziert werden (Kap. 3.3.7). Um zu prüfen, ob auch diese potentielle PNO gewebespezifisch im Fettkörper exprimiert wird, wurden verschiedene Gewebe Raupen von *A. caja* entnommen, die kurz vor der Verpuppung standen. In diesem Stadium ließen sich die Gewebe des Generalisten gut isolieren und lagen in ausreichend großer Menge für eine RNA-Isolierung vor. Die Raupen wurden von einem Züchter bezogen, der sie mit einer Mischung von Endiviansalat, Löwenzahn und Brombeeren-Blättern gefüttert hatte. Nach Erhalt bekamen sie Kopfsalat und Löwenzahn-Blätter. Sie wurden somit in der Vorbehandlung mit nicht Pyrrolizidinalkaloid-haltiger Nahrung aufgezogen.

Primer 48

Reverse-Primer

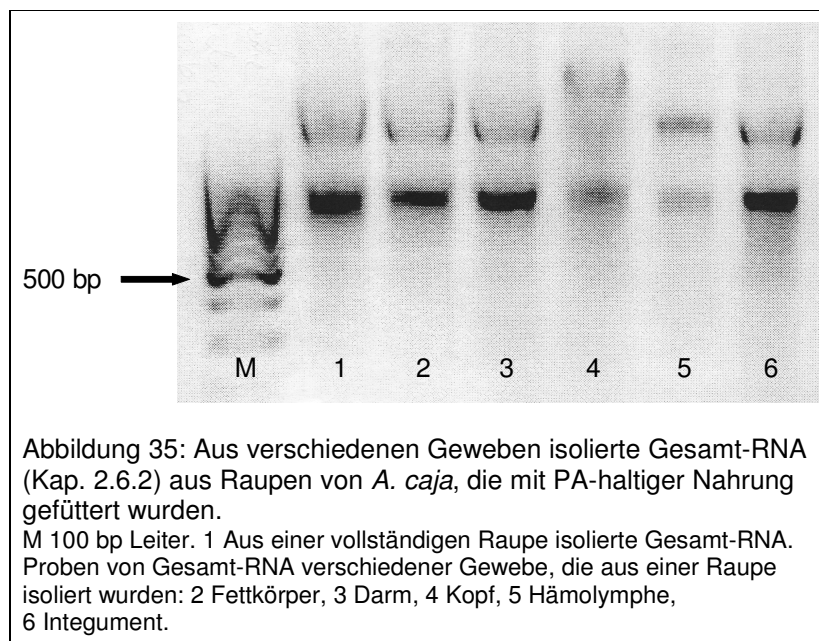
5' - CCA GGA AAA TCT GGC TGA TTG TAT ATT TTG AA - 3'

$T_m = + 63,1^\circ\text{C}$

Abbildung 34: Primer der mit Primer 43 (Abbildung 30, S. 101) für die Amplifizierung einer *N*-terminalen Teil-Sequenz der cDNA (codierender Bereich von 1-706 bp) der potentiellen PNO von *A. caja* in der RT-PCR eingesetzt wurde.

Für die CYP450-Enzyme von *Helicoverpa zea* wie z. B. für CYP6B27 konnte neben einer gewebespezifischen Expression (Darm und Fettkörper) auch eine Induktion der Transkription durch z. B. Indol-3-carbinol nachgewiesen werden (Li et al., 2002). Da beim Nachweis einer *N*-Oxygenierung von tertiären PAs in Hämolymphe-Proben von *Eilema albicosta* für einige Raupen eine Aktivität nachgewiesen werden konnte und für andere Raupen, die unter gleichen Bedingungen (ohne PA) aufgezogen worden waren, keine Aktivität nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.1.2), wurden einige Raupen von *A. caja*, die auf eine gewebespezifische Expression geprüft werden sollten, gezielt ohne bzw. mit einer Zufütterung von Senecionin aufgezogen. Hierfür wurde eine Gruppe von drei *A. caja*-Raupen weiterhin mit Löwenzahn-Blättern gefüttert (Kontrollgruppe ohne PAs). Für die zweite Gruppe wurden jeweils frisch Blattteile von Löwenzahnblättern mit 20 µl einer 2 mM Senecionin-Lösung bestrichen. Nach Antrocknen der Lösung wurden die so imprägnierten Blattfragmente verfüttert. Die Raupen erhielten somit je Blattfragment  $4 \cdot 10^{-8}$  mol Senecionin (PA-gefütterte Tiere). Die Fütterung der PA-Kost erfolgte über 77 Stunden. In diesem Zeitraum erhielten sie viermal mit Senecionin bestrichene Blattfragmente. Die erste Gabe der PA-Kost erfolgte zu Beginn, die zweite nach 4 Stunden und danach alle weiteren ca. alle 24 Stunden. Zwischendurch erhielten sie zweimal Löwenzahnblätter ohne Zusatz von PAs.

Nach Ablauf der Anfütterung wurden die Tiere mindestens 20 min auf Eis gekühlt und anschließend zusätzlich mit Dichlormethan betäubt. Bei den Tieren, die für die Gewebeisolierung vorgesehen waren, wurde die Hämolymphe mit einer Kapillare abgenommen. Die weitere Gewebeisolierung erfolgte unmittelbar im Anschluss. Nach Aufarbeitung wurden die Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Tiere, die für die Materialgewinnung ganzer Raupen vorgesehen waren, wurden sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und ebenfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert. Aus den Geweben Fettkörper, Darm, Integument und Hämolymphe wurde Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.6.2) und hiervon 1  $\mu\text{g}$  bzw. die gesamte verfügbare RNA-Menge der Präparation für die cDNA-Synthese (Kap. 2.6.3) mit dem Oligo(dT)-Primer (Kap. 2.4) eingesetzt.



Da Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* für die dort identifizierte FMO-2 eine Expression im Kopf belegten (Scharf et al., 2004), wurde auch bei *A. caja* Gesamt-RNA aus dem Kopf isoliert und in cDNA umgeschrieben. Um zu prüfen, ob die Messergebnisse der photometrischen Quantifizierung der eingesetzten Gesamt-RNA nicht durch degradierte RNA hervorgerufen wurde (Kap. 2.6.2), wurde parallel zur cDNA-Synthese 1  $\mu\text{g}$  RNA bzw. bei den Hämolymphe-Proben, in deren Präparationen eine nicht ausreichende Gesamtmenge zur Verfügung stand, ein Volumen von 7  $\mu\text{l}$  elektrophoretisch untersucht (Abbildung 35).

Für die Untersuchung der gewebespezifischen Expression der potentiellen PNO von *A. caja* wurde cDNA, die aus der RNA von Geweben der Raupen hergestellt wurden, die mit Pyrrolizidin-alkaloiden angefüttert worden waren, für die RT-PCR eingesetzt. Nach einem Vergleich der Aminosäure-Sequenz der FMO und der potentiellen PNO von *A. caja* wurden zwei Sequenz-Motive für die Konstruktion von spezifischen Primern für die RT-PCR ausgewählt. Am N-terminalen Sequenz-Abschnitt wurde die AS-Sequenz von AS 24 – 32 der potentiellen PNO für den Forward-Primer ausgewählt, da sich die AS-Sequenzen an dieser Stelle deutlich unterschieden (vgl. Abbildung 7, S. 63 bzw. Abbildung 16, S. 80). Ein geeigneter Primer stand bereits durch den Expressionsprimer für die potentielle PNO von *A. caja* zur Verfügung (Primer 43, Abbildung 30, S. 101). Zur Konstruktion des Reverse-Primers (Primer 48, Abbildung 34) wurde die potentiell PNO-spezifische AS-Sequenz von AS 247 – 257 als Matrize verwendet (Abbildung 16, S. 80).



Bei Verwendung der Primer 43 und 48 konnte ein Amplifikat für die Teilsequenz der potentiellen PNO von 706 bp erwartet werden. Als Positiv-Kontrolle wurde das Expressionskonstrukt der PNO aus *A. caji* eingesetzt (Kap. 3.6.1.2). Um die Bildung von unspezifischen Amplifikaten durch mögliche Kontaminationen auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle verwendet, die statt einer cDNA-Probe Wasser enthielt. Die RT-PCR wurde mit der Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen) und dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt:

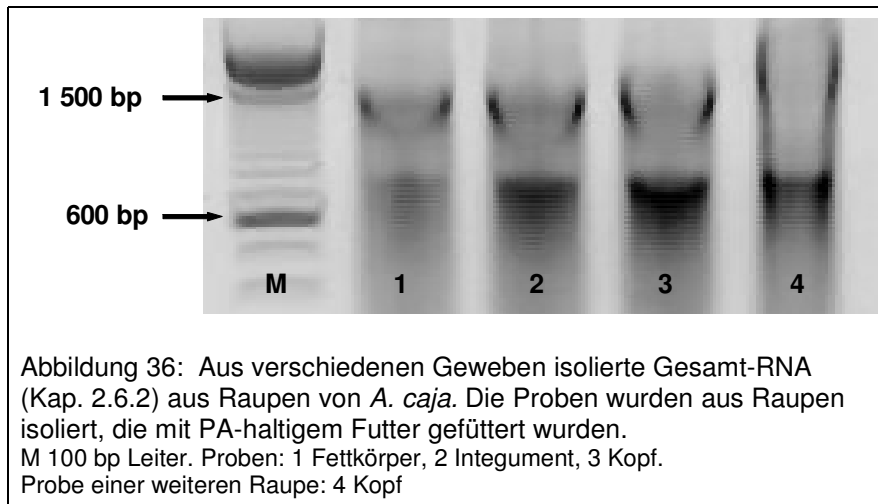
TEMPERATURPROGRAMM FÜR DIE RT-PCR DER POTENTIELLEN PNO VON *A. CAJA*

+ 94°C	2 min	} 10 Zyklen, in denen die Annealingtemperatur um 0,5°C je Zyklus verringert wurde
+ 94°C	45 sec	
+ 62°C - + 57°C	1 min	
+ 72°C	2 min	
+ 94°C	45 sec	} Zyklen, in denen die Annealingtemperatur konstant gehalten wurde. Nach einer Zyklenanzahl von 16 Zyklen mit konstanter Annealingtemperatur wurde die erste Probe genommen (26 Zyklen). Die weiteren Proben wurden nach Durchlaufen von jeweils drei weiteren Zyklen mit konstanter Annealingtemperatur bis zu einer Zyklus-Gesamtanzahl von 38 Zyklen genommen.
+ 57°C	1 min	
+ 72°C	2 min	

In Abbildung 37 ist das Ergebnis dieser ersten RT-PCR dargestellt. Die nach nur 26 Zyklen in der cDNA-Probe aus dem Kopf einer Raupe, die vor Isolierung der Gesamt-RNA mit PAs gefüttert wurde, sehr schwach erkennbare Bande von ca. 700 bp zeigt nach weiteren 3 Zyklen bereits eine deutlich erkennbare Intensität. Die cDNA-Probe aus dem Fettkörper führte nach 32 Zyklen zu einer deutlichen Bande von ca. 700 bp. Die erhaltenen Banden weisen mit ca. 700 bp die nach Vergleich mit der identifizierten Sequenz der potentiellen PNO von *A. caji* errechnete Größe auf. Eine weitere, nur schwach erkennbare Bande tritt lediglich in der Probe der cDNA des Integumentes nach 32 Zyklen auf. Diese ist mutmaßlich auf Verunreinigungen durch den vom Integument nicht vollständig entfernten Fettkörper zurückzuführen. Die erhaltenen PCR-Produkte von Kopf und Fettkörper (Probe 2 und 4, Abbildung 37) wurden nach Abschluss der RT-PCR kloniert (Kap. 2.6.5) und sequenziert (Kap. 2.6.11). Das Ergebnis der Sequenzierung ergab, dass die durch die erste RT-PCR erhaltenen Amplifikate aus Kopf und Fettkörper mit einer Identität von 99,4 % auf NS-Ebene übereinstimmen. Auf AS-Ebene beträgt die Identität zueinander 100 %. Die Identitäten auf Nukleinsäureebene der PCR-Produkte vom Kopf und Fettkörper betragen 96,9 % bzw. 97,1 % zur cDNA des Expressionsklons von *A. caji*. Für die bestehenden Unterschiede zwischen den identifizierten PCR-Produkten von Kopf und Fettkörper zur cDNA des Expressionsklons kommen vor allem individuelle Unterschiede zwischen dem Tier, aus dem die RNA für die cDNA des Expressionsklons isoliert wurde, und dem Tier, aus dem die RNA für die RT-PCR isoliert wurde, in Betracht. Amplifikationsfehler, wie sie durch die fehlende 3'5'-Exonucleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase auftreten können, kommen hier ergänzend hinzu.

Das doch recht überraschende Ergebnis zeigt für die Transkription der potentiellen PNO von *A. caji* neben dem bei der SNO von *T. jacobaeae* schon bekannten Fettkörper (Naumann, 2003), dass die potentielle PNO bei *A. caji* darüber hinaus noch im Kopf transkribiert wird. Ein falsch positives Ergebnis für das Kopfgewebe durch Kontaminationen mit dem Fettkörper konnte aufgrund der Präparationsmethode zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, jedoch konnte davon ausgegangen werden, dass es sich im Verhältnis zum gesamten Kopfsegment um eine nur

geringe Menge Fettkörperhandelte. Um das Ergebnis der in Abbildung 37 dargestellten ersten RT-PCR zu bestätigen, wurde Gesamt-RNA aus Geweben zweier weiterer Raupen, die mit PAs gefüttert worden waren, isoliert (Abbildung 36). Die erhaltene Gesamt-RNA wurde wie zuvor in cDNA umgeschrieben und in einer zweiten RT-PCR eingesetzt (Abbildung 39).



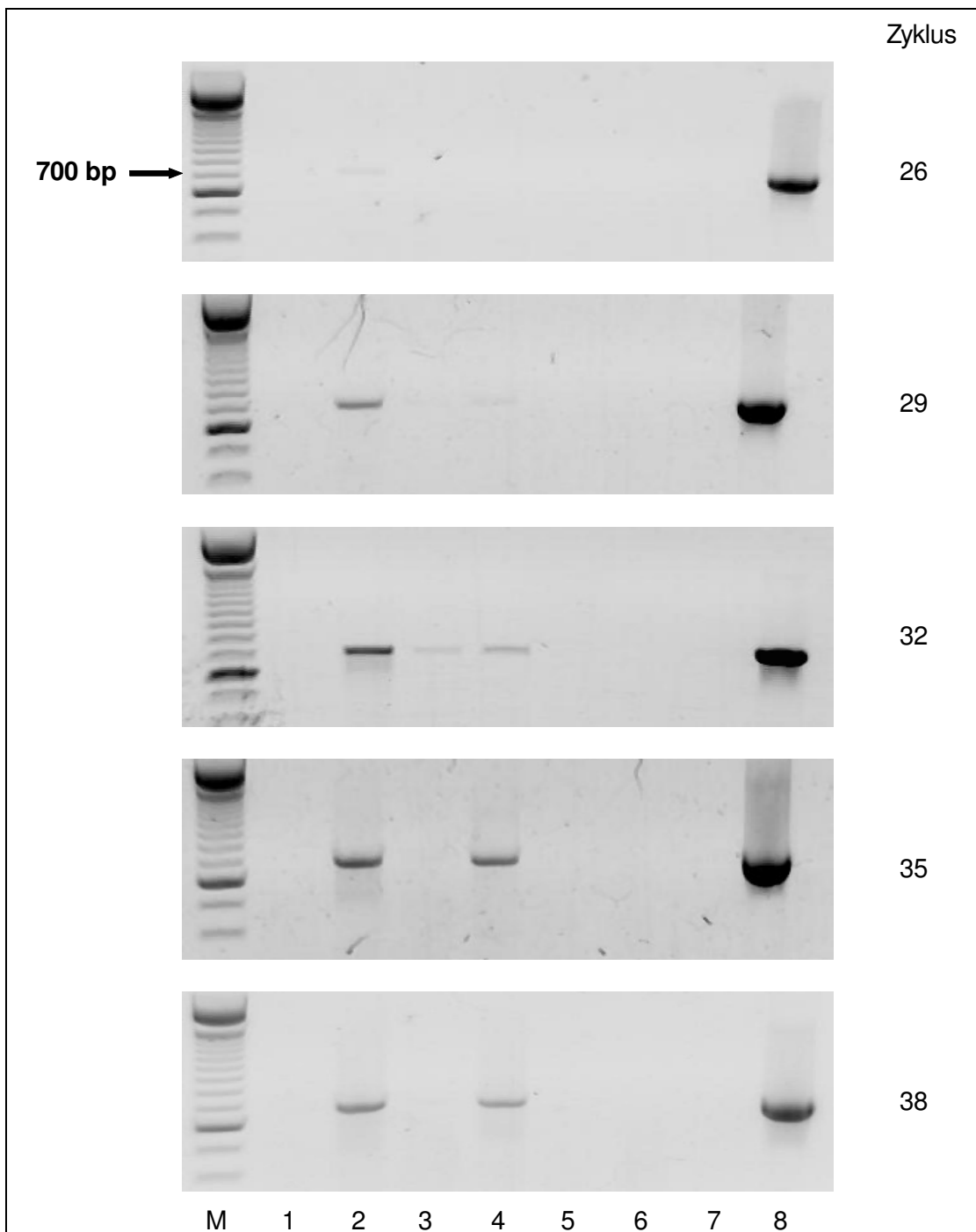
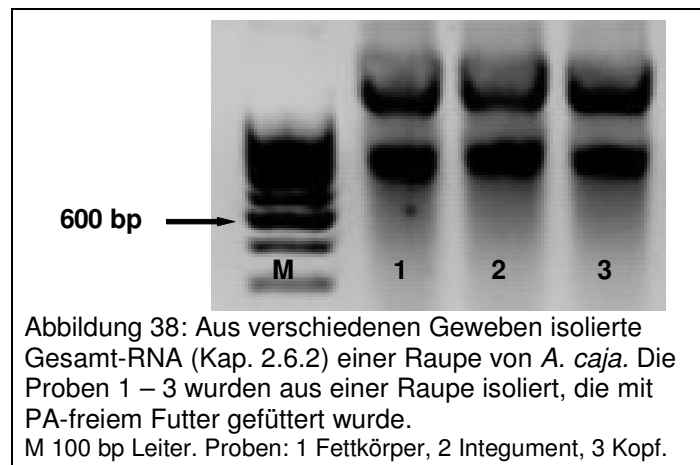


Abbildung 37: RT-PCR zur gewebespezifischen Transkription der potentiellen PNO aus *A. caji* mit den Primern 43 (Abbildung 30, S. 101) und 48 (Abbildung 34, S. 107). Für die RT-PCR wurde cDNA, die aus der Gesamt-RNA von verschiedenen Geweben PA-gefütterter Raupen von *A. caji* synthetisiert wurde (Abbildung 35), eingesetzt.

M 100 bp Leiter. 1 Probe aus einer vollständigen Raupe. Proben verschiedener Gewebe: 2 Kopf, 3 Integument, 4 Fettkörper, 5 Hämolymphe, 6 Darm. 7 Negativ-Kontrolle (mit Wasser statt cDNA). 8 Positiv-Kontrolle mit Plasmid-DNA vom Expressionsklon für die potentielle PNO von *A. caji* (Kap. 3.6.1.2).

Um im gleichen Ansatz zu prüfen ob die Transskription der potentiellen PNO durch Aufnahme von Pyrrolizidinalkaloide bei *A. caja* induzierbar ist, wurde wie zuvor von Kopf, Fettkörper und Integument einer Raupe, die mit einer PA-freien Kost aufgezogen worden war, Gesamt-RNA isoliert (Abbildung 38) und in cDNA umgeschrieben. In Übereinstimmung mit der ersten RT-PCR (Abbildung 37) konnte in den Proben von Raupen, die mit PAs gefüttert worden waren, bereits nach 26 Zyklen ein ca. 700 bp großes Amplifikat in den Proben von Kopf und Fettkörper beobachtet werden (Abbildung 39). Auch in der Probe des Integuments trat etwas verzögert ein ca. 700 bp großes Amplifikat auf, welches mutmaßlich auf anhaftende Reste von Fettkörper zurückzuführen ist, die bei der Präparation nicht vollständig entfernt werden konnten. Die zweite RT-PCR bestätigte für *A. caja* den Fettkörper und den Kopf als Ort der Transkription der potentiellen PNO.



Im Gegensatz zu den Proben von Raupen, die mit PAs gefüttert worden waren, und der Positivkontrolle konnte unter denselben Bedingungen in den Proben von Kopf und Fettkörper einer Raupe, die mit einer PA-freien Kost gefüttert worden war, kein Amplifikat erzielt werden (Abbildung 39, Proben 5 und 6). Dies ließ auf eine nur sehr geringe oder fehlende Transkription der potentiellen PNO bei dem untersuchten Generalisten schließen. Die potentielle PNO von *A. caja* wird somit offenbar nicht konstitutiv transkribiert. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass die potentielle PNO von *A. caja* erst nach Kontakt der Raupen mit einer PA-haltigen Nahrung exprimiert wird und somit induzierbar ist.

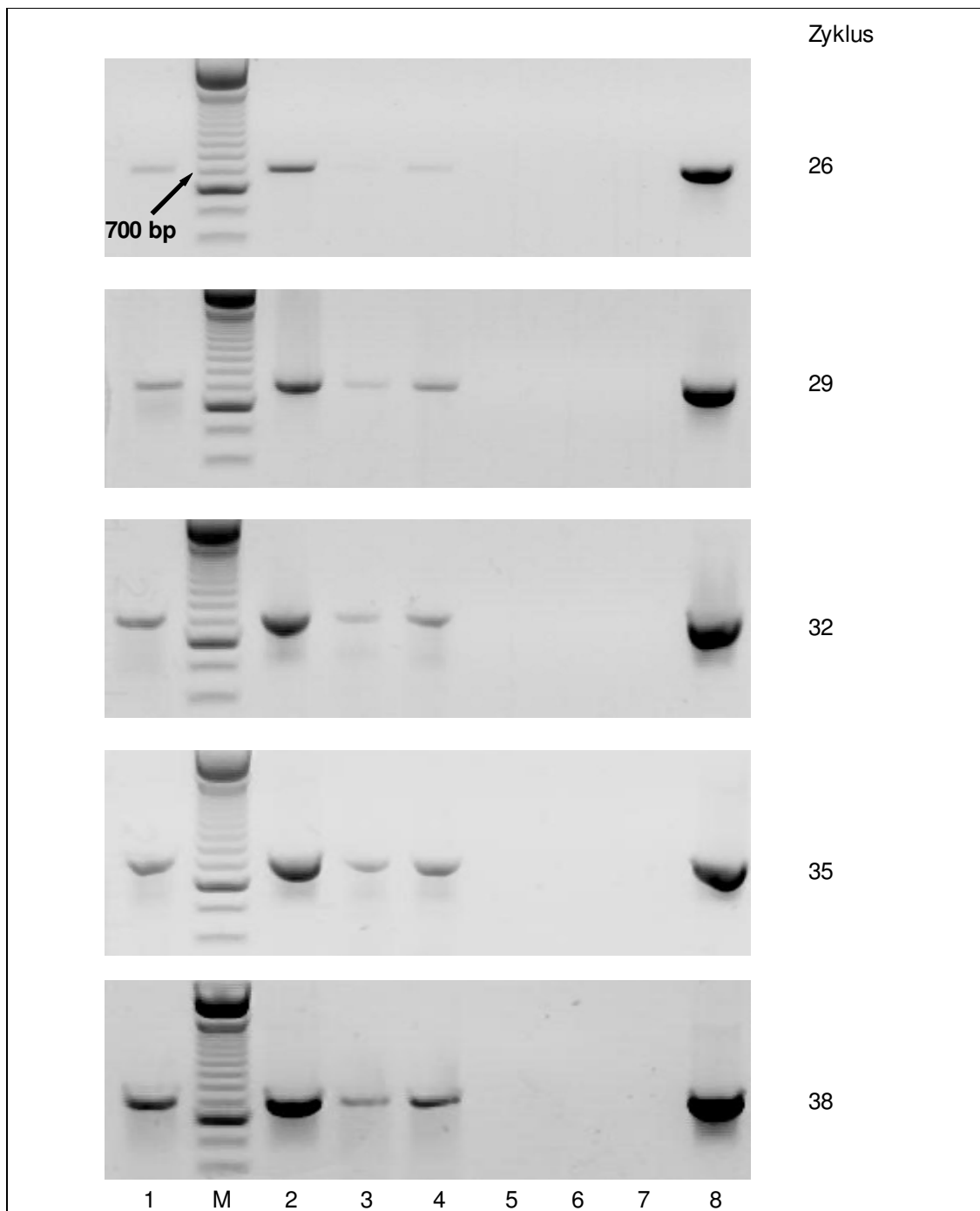


Abbildung 39: Zweite RT-PCR zur gewebespezifischen Transkription der potentiellen PNO aus *A. caji* mit den Primern 43 und 48. Für die RT-PCR wurde cDNA, die aus der Gesamt-RNA von verschiedenen Geweben von Raupen synthetisiert wurde, eingesetzt. Die Proben 1 – 4 wurden Raupen entnommen, die mit PA-haltigem Futter gefüttert wurden. Zum Vergleich wurde die cDNA einer Raupe eingesetzt, die nicht mit PA gefüttert wurde (Proben 5 und 6).

M 100 bp Leiter. Proben von Geweben einer Raupe: 1 Kopf, 2 Fettkörper, 3 Integument. Probe einer weiteren Raupe: 4 Kopf. Probe einer Raupe, die nicht mit PAs gefüttert wurde: 5 Kopf, 6 Fettkörper. 7 Negativ-Kontrolle (mit Wasser statt cDNA). 8 Positiv-Kontrolle mit Plasmid-DNA vom Expressionsklon für die potentielle PNO von *A. caji* (Kap. 3.6.1.2).

## 4 Diskussion

### 4.1 Nutzungsaspekte der PAs für angepasste Arctiiden

Pflanzliche Sekundärstoffe spielen bei einer Reihe von Insekten eine zentrale Rolle als Teil ihrer von Pflanzen erworbenen, chemischen Verteidigung. So stellen für *Manduca sexta* die *Nicotiana*-Alkaloide (z. B. Nicotin) die für die chemische Verteidigung effektivste Stoffgruppe dar (Kessler und Baldwin, 2002). Aber auch andere Stoffgruppen spielen für Lepidopteren eine wichtige Rolle für eine effektive chemische Abwehr gegen Fraßfeinde. So konnten Arctiiden identifiziert werden, die Herzwirksame Glykoside (Cardenolide) sequestrieren (Übersicht hierzu Weller et al., 1999). Auch für diese Stoffgruppe stützen Ergebnisse, die eine spezifische Erkennung bzw. Reizauslösung durch neuronale Zellen bei *Estigmene acrea* belegen (Bernays et al., 2002a), eine gezielte Aufnahme und Nutzung der pflanzlichen Sekundärstoffe. Eine weitere, von einzelnen Arctiiden genutzte Gruppe pflanzlicher Sekundärstoffe, deren potentieller Nutzen jedoch bislang noch nicht gut untersucht wurde, stellen die Iridoide dar. Für *G. geneura* konnte für Catalpol, einem Hauptbestandteil der Iridoidglykoside von *Plantago lanceolata*, eine phagostimmulierende Wirkung durch Reizung neuronaler Zellen nachgewiesen werden (Bernays et al., 2002b).

Doch die bedeutendste Gruppe pflanzlicher Sekundärstoffe, die von Arctiiden als chemische Abwehr eingesetzt wird, sind die Pyrrolizidinalkaloide (Hartmann, 1999, Hartmann und Ober, 2000). Ihre Bedeutung wird durch die vielfältigen Anpassungen im Umgang mit den toxischen Pyrrolizidinalkaloiden indiziert. Die essentielle Voraussetzung für die Nutzung dieser Alkaloide ist die biochemische Konvertierbarkeit der tertiären PAs in eine metabolisch sichere Speicherform, das *N*-Oxid. Fraßfeinde von PA-haltigen Pflanzen bzw. von den durch aufgenommene PAs geschützten Arctiiden, nehmen die *N*-Oxid-Form mit der Nahrung auf, die im reduktiven Darmmilieu in die tertiäre Base umgewandelt wird. In dieser Form kann das lipophile Alkaloid passiv absorbiert werden (Lindigkeit et al., 1997). Neben einigen anderen Lepidopteren (Nymphaliden) konnte bei den Arctiiden für eine besonders große Anzahl von Arten eine *N*-Oxygenierung der tertiären Pyrrolizidinalkaloide (Biller, 1993, Lindigkeit, 1996, vgl. Kap. 3.1) und sukzessive Speicherung im Körper nachgewiesen werden (Nickisch-Rosenegk und Wink, 1993, Lindigkeit et al., 1997, Hartmann, 1999, Hartmann und Ober, 2000, Hartmann et al., 2004b, Hartmann et al. 2004c). Die Arctiiden können somit nicht nur eine Nahrungsressource nutzen, die durch die Pyrrolizidinalkaloide anderen Konkurrenten nicht zugänglich ist, sondern verfügen durch Speicherung der Alkaloide in peripheren Geweben (Integument) über eine chemische Verteidigung gegen eigene Fraßfeinde.

Durch die Speicherung der mit der Nahrung aufgenommenen PAs verbleiben diese nicht nur im Körper der Raupen, sondern bleiben über die Verpuppung bis hin zum adulten Tier erhalten (Hartmann et al., 2004b, Hartmann et al., 2004c). Einige Arctiiden synthetisieren darüber hinaus insektenspezifische Pyrrolizidinalkaloide. Nach Aufnahme der tertiären PAs werden die Esterbindungen gespalten. Die nach der Spaltung verfügbaren Necinbasen werden nachfolgend mit insektenspezifischen Necinsäuren erneut verestert (Hartmann, 1999, Hartmann und Ober 2000). Diese Syntheseleistungen führen bei den bislang hierfür bekannten Arten zur Bildung von zwei unterschiedlichen PA-Strukturtypen, den Callimorphinen und den Creatonotinen, die über das Verpuppungsstadium bis zum adulten Tier erhalten bleiben (Hartmann, 1999, Hartmann et al. 2004b, Hartmann et al., 2004c, Hartmann et al. 2005). Die Synthese der insektenspezifischen PAs ist somit wie die *N*-Oxygenierung keine Metabolisierung für eine bessere Exkretion von PAs

sondern könnte vielmehr mit dem Transferieren ins adulte Stadium in Verbindung stehen. Als mögliche Ursache hierfür kommt der Erhalt der PAs und somit die Nutzbarkeit für das adulte Tier in Betracht. Da aber bei einigen Arten eine nur unvollständige oder keine Synthese von insektenspezifischen PAs nachgewiesen werden konnte, ist die Reveresterung möglicherweise aber auch eine Anpassung an die nach der Verpuppung andere Lebensweise. Hierbei könnten die insektenspezifischen PAs eine notwendige Modifizierung des Alkaloid-Bouquets zur Verteidigung gegen andere Fraßfeinde wie z. B. Fledermäuse sein (Hristov und Conner, 2005). Die Nutzung der PAs ist bei einigen Arctiiden von so großer Bedeutung, dass der Gehalt der sequestrierten Alkaloide den Fortpflanzungserfolg maßgeblich beeinflusst. So werden von Arten wie *Utetheisa ornatrix* von den Männchen spezielle Emissionsorgane ausgebildet (Coremata), über die das aus Pyrrolizidinalkaloiden gebildete Hydroxydanaidal abgegeben wird, damit es seine Pheromonwirkung entfalten kann. Der Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden korreliert offenbar mit der Menge des synthetisierten Hydroxydanaidal, welches konzentrationsabhängig die Attraktivität für die Weibchen erhöht. Für Arten wie *Cosmosoma myrodora* und *Utetheisa ornatrix* konnte auch eine Übertragung von Pyrrolizidinalkaloiden auf das Weibchen bzw. die Eier nachgewiesen werden. So verfügen bereits die Eier über einen effektiven Schutz gegen mögliche Fraßfeinde bzw. Parasiten (Conner et al., 2000, Bezzerides et al., 2004).

Grundlage aller Adaptionsmechanismen für eine sichere Nutzung der Pyrrolizidinalkaloide bei Arctiiden ist die enzymatische Umsetzung der tertiären Alkaloide in das korrespondierende *N*-Oxid. Das für diese gezielte Metabolisierung verantwortliche Enzym konnte bei *T. jacobaeae* als eine lösliche Flavin-abhängige Monooxygenase, die Senecionin-*N*-Oxygenase (SNO), identifiziert werden (Lindigkeit, 1996, Naumann et al., 2002). Die SNO wird im Fettkörper von *T. jacobaeae* gebildet und über den vesikulären Transport in den Extrazellularraum sezerniert. Als lösliches Enzym der Hämolymphe werden von der SNO alle absorbierten Pyrrolizidinalkaloide, die eine toxische Wirkung entfalten können, enzymatisch in das *N*-Oxid überführt (Lindigkeit et al., 1997). Bisherige Ergebnisse demonstrieren, dass die Toxizität der Pyrrolizidinalkaloide an spezifische Strukturmerkmale geknüpft ist (Mattocks, 1986, Fu et al., 2002). So weisen PAs, die sich als toxisch erwiesen haben, eine Doppelbindung an Position 1,2 der Necinbase, eine Veresterung der allylischen Hydroxylgruppe an Position 9 und eine freie oder veresterte Hydroxylfunktion an Position 7 auf (Abbildung 1, S. 5). Diese Strukturmerkmale sind sowohl für die SNO von *T. jacobaeae* (Lindigkeit, 1996) bzw. nach bisherigen Ergebnissen für die PNO von *G. geneura* (Kap. 3.3.5 und 3.6.2) als auch für die mikrosomalen Cytochrom P450-Enzyme die Voraussetzung für die Umsetzung der Pyrrolizidinalkaloide. Die enzymatische Aktivität der Cytochrom P450-Enzyme führt jedoch zu reaktiven Pyrrolderivaten, die für die toxische Wirkung verantwortlich gemacht werden (Fu et al., 2002). Wie für nicht angepasste Lepidopteren nachgewiesen führt die Aufnahme von Pyrrolizidinalkaloiden zur Schädigung nicht angepasster Fraßfeinde, die durch den Tod eine weitere Entwicklung der Individuen unmöglich machen können (Naberhauset al., 2005).

Bei einigen Pflanzen, wie z. B. einem *Phalaenopsis*-Hybriden, konnten aber auch PAs identifiziert werden, die von den o. g. Strukturmerkmalen abweichen. Durch Fütterungsversuche an isolierten Blütenständen von *Phalaenopsis* konnte mit dem radioaktiv markiertem Substrat Putrescin gezeigt werden, dass mit den in jungen Blütenkospen synthetisierten PAs 1R-*Phalaenopsin* und 1S-*Phalaenopsin* PAs synthetisiert worden sind, deren Necinbasen weder eine Hydroxylfunktion an Pos. 7 noch eine 1,2-Doppelbindung aufweisen. Die Expression des für die PA-Synthese ersten, spezifischen Enzyms, die Homospermidinsynthase (HSS), wird bei *Phalaenopsis* gewebe- und entwicklungsspezifisch gesteuert (Anke et al, 2008). Eine derart komplexe Steuerung der Synthese von PAs, denen für eine Wirkung angenommene, wichtige Strukturmerkmale fehlen, und deren

Akkumulation in Geweben, die für die Reproduktion essentiell sind, lässt eine für die Pflanze wichtige Funktion erwarten. In diesem Zusammenhang weisen auch Ergebnisse bei Arctiiden auf eine wichtige Funktion der PAs hin, denen für eine chemische Abwehr potentiell wichtige Strukturmerkmale fehlen. So konnte belegt werden, dass von dem Endemiten *Utetheisa galapagensis* auch Pyrrolizidinalkaloide ohne Doppelbindung an Position 1,2 (Tournefortin A + B) enzymatisch in das *N*-Oxid umgesetzt und gespeichert werden (Roque-Albelo et al., 2002). Dies weist darauf hin, dass auch PAs, die von den zuvor definierten Strukturanforderungen, wie z. B. der Doppelbindung an Pos. 1,2 der Necinbase, abweichen, für die Arctiiden eine wichtige Funktion übernehmen. In diesen Kontext fügen sich auch Ergebnisse wie sie schon für die *N*-Oxygenierung von 1,2-Dihydrointermedin in einer Population von *Placidula euryanassa* (Nymphalidae) nachgewiesen werden konnten (Freitas et al., 1996). Ob die Pyrrolizidinalkaloide mit gesättigtem Basenkörper über eine andere Aktivität verfügen oder die enzymatische Aktivität der hierfür mutmaßlich verantwortlichen PNO bei den untersuchten Lepidopteren sich aufgrund einer breiteren Substratspezifität auch auf PAs erstreckt, die nicht über alle für eine Biotoxifizierung notwendigen Strukturmerkmale verfügen (Kap. 1.3), muss erst noch in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Doch für eine wichtige Funktion dieser PAs spricht auch das bei Raupen und adulten Tieren von *G. geneura* nachgewiesene Alkaloidbouquet (Hartmann et al., 2005). Aufgenommene PAs werden im Verlaufe der Individualentwicklung in 1,2 – Dihydrocallimorphine umgesetzt, die offenbar in einer Größenordnung von ca. 60 % im adulten Tier vorliegen. Darüber hinaus konnte bei *G. geneura* eine offenbar spezifische, enzymatische Hydroxylierung von tertiären Basen nachgewiesen werden. So konnte nach Aufnahme von Phalaenopsin für die Necinbase Trachelanthamidin, die keine 1,2-Doppelbindung und an Position 7 keine Hydroxylfunktion aufweist, eine spezifische Einführung der Hydroxylfunktion an Position 7 belegt werden (Hartmann et al., 2005). Nach erneuter Veresterung mit körpereigenen Necinsäuren verbleiben diese insektenspezifischen PAs im Körper der Insekten als 1,2-Dihydroverbindungen.

Derartige spezifische Anpassungen zur Metabolisierung von PAs, denen für eine Wirkung mutmaßlich wichtige Strukturmerkmale fehlen, weisen auf eine wichtige bislang aber nicht erkannte Funktion hin. Aufgrund der physiko-chemischen Eigenschaften (Lipophilie) auch dieser Verbindungen ist eine *N*-Oxygenierung, wie sie schon bei *Utetheisa galapagensis* nachgewiesen werden konnte (Roque-Albelo et al., 2002), für eine dauerhafte Speicherung offenbar erforderlich.



## 4.2 Funktion von Flavin-abhängigen Monooxygenasen

### 4.2.1 FMOs im Tierreich

Die Flavin-abhängigen Monooxygenasen sind ein im Tierreich weitverbreitetes Enzymsystem (Schlenk und Buhler, 1991, Ziegler, 1993, Cashman, 1995, Lindigkeit et al., 1997, El-Alfy und Schlenk, 2002, Scharf et al., 2004). Im Gegensatz zu den tierischen Cytochrom P-450 Enzymen sind von den tierischen Flavin-abhängigen Monooxygenasen jedoch nur eine geringe Anzahl je Tierart bekannt. So konnte nach dem Genomprojekt in *Saccharomyces cerevisiae* lediglich eine Sequenz für eine FMO identifiziert werden, die nach biochemischen Versuchen als FMO bestätigt werden konnte (Suh et al., 1996). Für einige Lepidopteren wie *Helicoverpa armigera* und *Bombyx mori* sind bislang ebenfalls nur cDNA-Sequenzen einer Flavin-abhängigen Monooxygenase je Tierart bekannt. Bei anderen Insekten wie *Drosophila melanogaster* konnten hingegen zwei FMOs identifiziert werden (Scharf et al., 2004). Eine Ausnahmescheine hier die FMOs der Säugetiere zu bilden, von denen beim Menschen sechs unterschiedliche cDNA (FMO1 – 6) identifiziert werden konnten (Cashman, 1995, Hines et al., 2002).

Die bekannten Flavin-abhängigen Monooxygenasen zeigen trotz einiger Unterschiede doch eine Reihe von Charakteristika wie die FAD- und die NADPH-Bindungsstelle, die über die Artgrenzen hinweg eine hohe Übereinstimmung aufweisen. Viele der bekannten FMOs sind als mikrosomale Enzyme mit dem Kompartiment Endoplasmatisches Retikulum (ER) verknüpft. Dies gilt ausnahmslos für die FMOs der Säugetiere (Cashman, 1995). Aber auch in weit entfernten Tiergruppen, wie bei den Fischen *Oryzias latipes* und *Oncorhynchus mykiss*, können in Mikrosomenpräparationen Aktivitäten von FMOs nachgewiesen werden (El-Alfy und Schlenk, 2002, Schlenk und Buhler, 1991). Bei der FMO von *Saccharomyces cerevisiae* konnte eine ER-Assoziation auf der zytosolischen Membranseite nachgewiesen werden (Suh et al., 1999a). Die ER-Assoziation kann durch den Einsatz von etwas stärkeren Puffern (Carbonat oder Glucose-6-Phosphat) vom Endoplasmatischem Retikulum getrennt werden. Eine Zwischenstellung konnte für FMO1 und FMO2 von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden (Scharf et al., 2004). Beide Enzyme konnten mit Antikörpern sowohl im Zytoplasma als auch in mikrosomalen Präparationen detektiert werden. Die Flavin-abhängige Monooxygenase von *Trypanosoma cruzi* (Protozoa) konnte als lösliches Enzym im Zytoplasma nachgewiesen werden (Agosin und Ankley, 1986). Im Gegensatz hierzu nimmt die Senecionin-N-Oxygenase (SNO) von *Tyria jacobaeae* eine Sonderstellung ein. Sie verfügt über eine N-terminale Signalsequenz und wird durch diese aus den Zellen ausgeschleust (Naumann, 2003). Im Kontrast zu den anderen FMOs ist die SNO von *T. jacobaeae* ein lösliches, extrazelluläres Enzym der Hämolymphe (Lindigkeit, 1996, Naumann et al., 2002).

Im Bereich der Funktionen zeichnen sich aufgrund der bislang bekannten Aktivitäten zwei unterschiedliche Gruppen ab. So konnte für die FMO von *S. cerevisiae* eine wichtige Funktion in der Bereitstellung von Redoxäquivalenten für die Zelle erkannt werden (Suh et al., 1999a). Die FMO von *S. cerevisiae* oxidiert schwefelhaltige Nucleophile wie Glutathion, Cysteamin und Cystein. Hierbei ist die enzymatische Oxidation von Glutathion zu Glutathiondisulfid als wichtigste physiologische Funktion anzusehen. Das durch die reduzierte und oxidierte Form des Glutathion korrespondierende Redoxpaar prägt durch unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse das Redoxmilieu von Zytoplasma und Endoplasmatischem Retikulum. So ist das Verhältnis von (reduziertem) Glutathion zu (oxidiertem) Glutathiondisulfid im Zytoplasma 100:1 mit einer

Gesamtkonzentration der Redoxäquivalente von ca. 10 mM. Das Zytoplasma zeichnet sich deshalb auch durch ein reduktives Milieu aus. Im Gegensatz hierzu weist das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums ein Verhältnis von (reduziertem) Glutathion zu (oxidiertem) Glutathiondisulfid von 1:1 bis 3:1 auf. Das resultierende stärker oxidierende Redoxmilieu spielt eine wichtige Rolle bei der richtigen Verknüpfung von Disulfidbrücken in Proteinen, die in das Lumen des ER importiert werden. Bei dieser FMO handelt es sich um ein Membran-assoziiertes Enzym, welches sich auf der zytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums befindet (Suh et al., 1999a). Dort werden durch die enzymatische Aktivität der FMO oxidierte Redoxäquivalente synthetisiert und mit hoher Wahrscheinlichkeit in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums über einen bislang nicht geklärten Mechanismus importiert. Die FMO von *S. cerevisiae* ist somit ein wichtiger Parameter für die Ausbildung des Redoxmilieus im Endoplasmatischen Retikulum.

Andere FMOs sind Teil einer physiologischen Antwort auf Umweltfaktoren. So konnten für die mikrosomalen FMOs der Fische *Oryzias latipes* (El-Alfy und Schlenk, 2002) und der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* (Schlenk und Buhler, 1991) gezeigt werden, dass durch höhere Salzgehalte die Expression der FMOs induziert wird. Die FMO-Aktivität führt zu einer vermehrten Umsetzung von Trimethylamin zu Trimethylaminoxid, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des Osmotischen Milieus ausübt. Trimethylaminoxid schützt darüber hinaus Proteine vor höheren Harnstoffkonzentrationen, die infolge erhöhter Salzgehalte gebildet werden (El-Alfy und Schlenk, 2002). Eine vergleichbare Aktivität bei der Umsetzung von Trimethylamin zu dem korrespondierenden *N*-Oxid konnte für die FMO3 beim Menschen nachgewiesen werden (Lang et al., 1998).

Für die meisten der bislang bekannten Sequenzen der Flavin-abhängigen Monooxygenasen von Insekten bestehen praktisch keine funktionelle Charakterisierungen, durch die den FMOs eine Funktion zugeordnet werden könnte. Lediglich die beiden Flavin-abhängigen Monooxygenasen von *Drosophila melanogaster* konnten in *E. coli* aktiv exprimiert und durch Aktivität mit Methimazol charakterisiert werden (Scharf et al., 2004). Zuvor gemachte Versuche diese FMOs heterolog in *E. coli* zu exprimieren und mit schwefelhaltigen Nucleophilen wie Cystein oder mit stickstoffhaltigen Nucleophilen wie Dimethylanilin zu charakterisieren lieferten keine Ergebnisse (Naumann, 2003). Für die Funktionen, die von diesen FMOs erfüllt werden, lassen sich lediglich Schlussfolgerungen aus der gewebe- und entwicklungsspezifischen Expression ableiten. So konnte nachgewiesen werden, dass die FMO1 von *D. melanogaster* vorzugsweise im Kopf von adulten Tieren exprimiert wird (Scharf et al., 2004). Sie könnte deshalb an neurophysiologischen Funktionen oder im Hormonstoffwechsel Anteil haben. Für die FMO2 von *D. melanogaster* besteht offenbar eine physiologische Funktion, die für eine Reihe von Geweben wichtig ist, da dieses Enzym in allen untersuchten Entwicklungsstadien und Geweben exprimiert wird (Scharf et al., 2004). Die FMO2 zeigt auch die deutlich höhere Aktivität mit Methimazol, so dass sie mutmaßlich für die Umsetzung von schwefelhaltigen Verbindungen in Frage kommt.

Die mutmaßlich größte Gruppe wird jedoch von FMOs gebildet, die Xenobiotika metabolisieren (Cashman, 1995, Lindigkeit, 1996, Ziegler, 1993). Hierbei handelt es sich um Phase I-Reaktionen, die nucleophile Zentren wie Stickstoff oder Schwefel in Xenobiotika-Verbindungen oxidativ angreifen. Die FMOs transformieren somit in Analogie zu den CYP450-Enzymen Xenobiotika, die dann in aller Regel über eine geringere Toxizität und eine bessere Wasserlöslichkeit verfügen, so dass sie besser exkretierbar sind. Sie sind somit Teil eines Metabolisierungssystems, welches Organismen den sicheren Umgang mit vielen Xenobiotika erlaubt. In einigen Fällen führt jedoch

die enzymatische Umsetzung von Xenobiotika durch Flavin-abhängige Monooxygenasen zu einer Biotoxifizierung. Dies konnte für die FMO von *Mycobacterium tuberculosis* gezeigt werden, da für die Wirkung des Therapeutikums Ethionamid erst eine enzymatische Umsetzung durch die bakterielle FMO erforderlich ist (Vannelli et al., 2002).

Die Funktionen, die die FMOs in der Metabolisierung von Xenobiotika ausüben, sind zu einem großen Anteil bei FMOs von Säugern an der Metabolisierung von Pharmaka und chemischen Leitsubstanzen untersucht worden. Da durch die dort verwendeten Substrate bei einer grösseren Anzahl von Flavin-abhängigen Monooxygenasen Aktivitäten gemessen werden konnten und physiologische Substrate häufig nicht bekannt sind, wurden häufig diese Leitsubstanzen für biochemische Charakterisierungen eingesetzt (Cahman, 1995, Ziegler, 1993). Für die zentrale Frage, welchen Einfluss bzw. Funktion die FMOs in der Metabolisierung von pflanzlichen Sekundärstoffen einnehmen, stehen deshalb deutlich weniger Charakterisierungen zur Metabolisierung von Xenobiotika zur Verfügung. Aus den Aktivitäten, die bei den bekannten Leitsubstanzen gemessen wurden, lassen sich deshalb häufig nur Rückschlüsse auf die physiologische Funktion der FMOs ziehen. Als eines der wenigen Beispiele konnte bei *O. latipes* die Metabolisierung des Insektizides Aldicarb nachgewiesen werden, die auf die Aktivität einer FMO zurückgeführt werden kann (El-Alfy und Schlenk, 2002). Im Bereich der pflanzlichen Sekundärstoffe ist die Metabolisierung bei Tieren nur bei wenigen Substanzen untersucht. So konnte für Cysteinokonjugate von Verbindungen des Knoblauchs (S-Allyl-L-Cystein, SAC), die in einem ersten Stoffwechselschritt gebildet wurden, Sulfoxidationen durch die Flavin-abhängigen Monooxygenasen 1 und 3 bei Nierenproben des Menschen nachgewiesen werden (Krause et al., 2003). Für die Metabolisierung von Nicotin konnte bei mikrosomalen Präparationen der Leber von Ratten eine den CYP450-Enzymen äquivalente enzymatische Aktivität der FMO1 nachgewiesen werden. Hierbei wird das Nicotin in das korrespondierende Nicotin *N*-Oxid umgesetzt (Katchamart et al., 2000).

Die SNO von *T. jacobaeae* bzw. die PNO von *G. geneura* sind die bislang einzigen Flavin-abhängigen Monooxygenasen der Insekten, die nicht nur durch eine Aktivität mit einem künstlichen Substrat charakterisiert sind, sondern deren physiologische Funktion bekannt ist (Lindigkeit et al., 1997, Naumann et al., 2002, Kap. 3.3.5 und 3.6.2). Darüber hinaus ist hiermit die einzig bekannte Metabolisierung von pflanzlichen Sekundärstoffen einer Flavin-abhängigen Monooxygenase der Insekten belegt. Wie bei allen bekannten FMOs wird in einer enzymatischen Reaktion eine nucleophile Struktur oxidativ umgesetzt. Die FMOs setzen somit enzymatisch Xenobiotika in eine weniger toxische Form um und nehmen für den Organismus essentielle Entgiftungsfunktionen wahr. So wird mit molekularem Sauerstoff und NADPH das tertiäre Amin der Pyrrolizidinalkaloidbasen oxidativ in das korrespondierende *N*-Oxid umgesetzt (Lindigkeit, 1996). Diese *N*-Oxid-Form stellt eine besser wasserlösliche Verbindung dar, die durch die CYP450-Enzyme nicht mehr als Substrat akzeptiert wird. Da somit die enzymatische Biotoxifizierung (vgl. Kap. 1.2) unterbleibt, ist das *N*-Oxid eine sichere Lagerform der Pyrrolizidinalkaloide, die vorwiegend in den äußeren Schichten (Integument) der Arctiiden gelagert wird. Die Speicherung dieser *N*-Oxide stellt dabei aber weit mehr als eine Entsorgung von Stoffwechsel-Endproduktendar. Die PAs fungieren bei angepassten Insekten, wie auch bei PA-haltigen Pflanzen (Hartmann 1999, Hartmann und Ober, 2000), als effektiver Schutz gegen Fraßfeinde. So konnte bei einigen Arctiiden wie z. B. *Utetheisa ornatrix*, die PAs enthielten, gezeigt werden, dass die Fledermaus *Eptesicus fuscus* diese nach sensorischer Prüfung als Nahrung zurückwies oder nur Teile der Falter fraß (Hristov und Conner, 2005). Mit den Pyrrolizidinalkaloid *N*-Oxiden verfügen die Arctiiden über

eine physiologisch sichere und gegen Fraßfeinde effektive chemische Abwehr, die für das Überleben dieser Arten wichtig ist (Hartmann, 1999, 2004a, Hartmann und Ober, 2000).

#### 4.2.2 FMOs und PNOs in Arctiiden

In der vorliegenden Arbeit konnten mehrere Flavin-abhängige Monooxygenasen von Arctiiden identifiziert werden (Kap. 3.3, ff.). Die Enzyme weisen typische Merkmale der FMOs auf. So verfügen alle über eine hoch-konservierte FAD-Bindungsstelle (Abbildung 13, S. 74), welche das für die Bindung des FAD essentielle Bindungsmotiv GxGxxG aufweist (Suh et al., 1999b). Dieses steht in Übereinstimmung zu den bekannten FMOs der Säuger (Cashman, 1995). Für die FMO1 des Kaninchens konnte die Beteiligung dieses Sequenz-Motivs an der FAD-Bindung belegt werden (Lawton und Philpot, 1993a). Ersetzt man das dritte Glycin der FAD-Bindungsstelle durch ein Valin so verliert die rekombinante FMO1 des Kaninchens vollständig die Fähigkeit FAD zu binden. Die Flavin-abhängigen Monooxygenasen der Arctiiden verfügen darüber hinaus über die für FMOs charakteristische zweite Nukleotidbindungsstelle. Das Sequenz-Motiv GxGxxG/A ist bei der SNO von *T. jacobaeae*, der PNO von *G. geneura* (AS 218 – 223), den potentiellen PNOs von *A. caji* und *A. villica* (AS 218 – 223) und bei den übrigen FMOs der Arctiiden (AS 219 – 224) die Bindungsstelle für das NADPH (Abbildung 13, S. 74 und Abbildung 4, S. 56). Interessanterweise scheint die dritte konservierte Position der NADPH-Bindungsstelle die beiden FMO-Gruppen der Arctiiden zu unterscheiden. Bei den bislang identifizierten (potentiellen) PNOs ist an dieser Position das Glycin und bei den FMO-Enzymen das Alanin vorzufinden (Abbildung 4, S. 56). Da beide Sequenz-Motive für die Bindung des für die Reaktionen essentiellen Coenzym verantwortlich sind, ist ein funktioneller Zusammenhang nicht unbedingt zu erwarten.

Bei der Identifizierung von Flavin-abhängigen Monooxygenasen der Arctiiden hat sich in besonderer Weise die molekularbiologische Suche mit degenerierten Primern bewährt (Kap. 3.3.1 ff.). So wurden mit den wenigen Sequenz-Informationen zu Beginn dieser Arbeit eine Reihe von degenerierten Primern entworfen, die über die Artgrenzen hinweg innerhalb der Arctiiden erfolgreich für die Isolierung von FMOs eingesetzt werden konnten (Kap. 3.3.1, ff.). Die anfänglich für die Konstruktion von degenerierten Primern verwendeten konservierten Sequenz-Motive wie die FAD-Bindungsstelle erwiesen sich auch bei den neu hinzu gewonnenen Sequenzen als konservierte Regionen und verfügen über das Potential auch noch andere Flavin-abhängige Monooxygenasen nicht nur innerhalb der Arctiiden sondern auch noch bei anderen Familien der Ordnung Lepidoptera zu amplifizieren. Inwieweit auch FMO-Sequenzen aus weiter entfernten Insektenfamilien bzw. Ordnungen erfolgreich amplifiziert werden können, bedarf einer kritischen Überprüfung. Mit jeder neuen Sequenz ließen sich die Primer sukzessiv an die potentiellen PNOs bzw. die FMOs anpassen (Kap. 3.3.6). So konnten eine Reihe von Primern entworfen werden, die mit einem geringeren Grad der Degeneriertheit für die Amplifizierung von FMOs oder potentiellen PNOs innerhalb der Arctiiden eingesetzt werden können. Die molekularbiologische Isolierung von Flavin-abhängigen Monooxygenasen mit degenerierten Primern bietet methodisch eine hohe Flexibilität, da jederzeit andere Sequenz-Motive durch die einfache Konstruktion der Primer als Ansatzpunkt verwendet werden können. Für die biochemische Isolierung (Lindigkeit, 1996) der SNO von *T. jacobaeae* war eine große Anzahl an Raupen nötig, die nur in wenigen Fällen zur Verfügung steht. Die geringe Verfügbarkeit der meisten Tiere ist bei der molekularbiologischen Isolierung mit (degenerierten) Primern jedoch kein limitierender Faktor. So wurden für die Isolierung der PNO von *G. geneura* (Kap. 3.3.5) nur 2 Raupen benötigt. Die Klonierung der entsprechenden cDNAs in Expressions-Vektoren bietet darüber hinaus durch heterologe Expression eine kontinuierliche Verfügbarkeit.

Nach Vervollständigung der jeweiligen cDNA kann diese im Detail einfach und eindeutig durch Sequenzierung identifiziert werden.

Für die SNO von *T. jacobaeae* konnte nachgewiesen werden, dass die enzymatische Umsetzung der Pyrrolizidinalkaloide in das korrespondierende *N*-Oxid streng NADPH-abhängig ist (Lindigkeit, 1996). Das Cosubstrat NADH führte zu keinem detektierbaren Umsatz. Diese im Gegensatz zu anderen FMOs stringente Spezifizierung unterscheidet die SNO von *T. jacobaeae* von den bekannten FMOs. Für die rekombinante PNO von *G. geneura* konnte eine enzymatische Aktivität mit dem Cosubstrat NADPH belegt werden (Kap. 3.6.2). Bei der rekombinanten FMO von *S. cerevisiae* konnte mit beiden Cosubstraten eine Aktivität detektiert werden (Suh et al., 1999b). Neben der NADPH-Bindungsstelle (AS 195 – 200) konnte für die Bindung des Cosubstrats bei dieser FMO die Beteiligung vor allem der Aminosäure Lysin an Position 219 nachgewiesen werden. Über diese Aminosäure bestehen offenbar essentielle Wechselwirkungen zum 2' Phosphatrest des NADPH. Wird die basische Aminosäure Lysin durch die saure Aminosäure Glutaminsäure ersetzt so kann die FMO das NADPH nicht mehr, das NADH jedoch weiterhin für enzymatische Umsetzungen verwenden (Suh et al., 1999b). Im Vergleich hierzu weist die AS-Sequenz der PNO von *G. geneura* an der dem Lysin 219 bei *S. cerevisiae* äquivalenten Position ein Histidin auf (Pos. 242, Abbildung 4, S. 56). Das Histidin an Pos. 242 wird dabei von einer kurzen, konservierten AS-Sequenz unbekannter Funktion flankiert (AS 239 – 243, -HSHHI-). Die kurze, über die Insekten-Grenzen konservierte Region (Abbildung 4, S. 56) zeichnet sich durch mehrere basische Aminosäuren aus, die in Analogie zur FMO von *S. cerevisiae* die Cosubstrat-Spezifität beeinflussen könnte. Aufgrund seiner basischen Struktur könnte Histidin in seiner protonierten Form als Ladungsausgleich bzw. als Wechselwirkungspartner (Wasserstoffbrücken) für z. B. den 2' Phosphatrest des NADPH dienen. Die offenbar hohe Konservierung der AS-Sequenz -HSHHI- (AS 239 – 243 bei *G. geneura*) über die Artgrenzen der Insekten hinweg, wie sie z. B. bei den Sequenzen der FMOs von *D. melanogaster* (vgl. Abbildung 13, S. 74) und den (potentiellen) PNOs wiederzufinden ist, legt eine gleiche Funktion nahe. Die konservierte Region (Pos. 239-243) bei *G. geneura*, Abbildung 4, S. 56 und Abbildung 13, S. 74 könnte dabei die ausschließliche Verwendung des Cosubstrates NADPH bedingen. Nachweise, die diese Annahme für die Insekten-FMOs bestätigen, stehen jedoch noch aus. Lediglich für die rekombinanten FMOs von *D. melanogaster* wurde bislang Aktivität mit NADPH belegt (Scharf et al., 2004).

Nach Analyse der im Rahmen dieser Arbeit isolierten FMO- und potentiellen PNO-Sequenzen mit SignalP 3.0 konnte für alle vollständigen Sequenzen eine N-terminale Signalsequenz für den vesikulären Transport identifiziert werden (Kap. 3.3.3, ff.). Im Falle der SNO von *T. jacobaeae* konnte die Exkretion auch durch Expressionsversuche bestätigt werden (Naumann, 2003). Aktivitätsmessungen mit der Hämolymphe von *N*-Oxygenierenden Arctiiden (Biller, 1993, Lindigkeit, 1996, Kap. 3.1) weisen auch alle anderen (potentiellen) PNOs als extrazelluläre Enzyme aus, die wie bei der potentiellen PNO von *A. caja* (Kap. 3.7) und der SNO von *T. jacobaeae* (Naumann, 2003) im Fettkörper transkribiert werden. Die extrazellulären PNOs können durch den offenen Hämolymphekreislauf der Raupen die tertiären Pyrrolizidinalkaloide, die über die für eine toxische Wirkung bekannten Strukturmerkmale verfügen (Kap. 1.3, Abbildung 1), in das korrespondierende *N*-Oxid überführen. Sie schaffen damit die so wichtige biochemische Voraussetzung Pyrrolizidinalkaloide sicher als Fraßschutz einsetzen zu können, ohne selbst Schaden zu nehmen.

Für die neu hinzugewonnene FMO-Gruppe der Arctiiden konnte gleichfalls eine N-terminale Signalsequenz für den vesikulären Transport vorhergesagt werden (Kap. 3.3.3, Kap. 3.3.4). Dies

durch Aktivitätsmessungen aus der Hämolymphe zu belegen scheiterte bislang an der fehlenden Kenntnis eines spezifischen Substrates. Aufgrund der doch recht ähnlichen Signalsequenzmuster kann der vesikuläre Transport der FMO-Enzyme in den Extrazellulärraum jedoch als wahrscheinlich angenommen werden. Auch für *Helicoverpa armigera* konnte eine FMO auf molekularer Ebene identifiziert werden, die nach Vorhersage mit SignalP 3.0 über eine N-terminale Signalsequenz verfügt. Bei der bislang bekannten FMO von *Bombyx mori* konnte jedoch nach Analyse mit SignalP keine Signalsequenz nachgewiesen werden. Diese FMOs weisen zu den FMOs der Arctiiden, zur SNO von *T. jacobaeae* und den (potentiellen) PNOs eine geringe Übereinstimmung auf. So bestehen Identität der FMO von *B. mori* zur FMO von *A. caca* von 47 % und zur SNO von *T. jacobaeae* von 52 % (vgl. Kap. 4.2.3).

Für weitere biochemische Untersuchungen besteht die Notwendigkeit ein geeignetes Expressionssystem bzw. Bedingungen zu etablieren, die es ermöglichen rekombinante FMO der Lepidopteren aktiv und reproduzierbar zu exprimieren. Bereits bei der SNO von *T. jacobaeae* zeigte sich die Schwierigkeit Arctiiden-FMOs mit *E. coli* in einer aktiven Form zu exprimieren (Naumann, 2003). Die Expression dieser SNO führte in allen Versuchen zu Proteinaggregaten, die nicht löslich waren und erst mit Detergenzien solubilisiert werden konnten. Vor der weiteren Verwendung mussten die Proteine renaturiert werden. Aktivitätsnachweise konnten auch dann nur im Dialysepuffer (pH= 8,0) erfolgen, da die in *E. coli* exprimierte SNO im Puffer mit neutralem pH-Wert nicht stabil löslich war. Die Charakterisierung der nativen SNO von *T. jacobaeae* erfolgte jedoch in einem 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH= 7,0, in dem das Enzym eine sehr gute Aktivität aufwies (Lindigkeit, 1996). Neben einer schlechten Löslichkeit wies die rekombinante SNO von *T. jacobaeae* auch eine nur geringe spezifische Aktivität im Vergleich zum nativen Enzym auf (Naumann et al., 2002). Hierfür zeigt sich mutmaßlich ein hoher Anteil von rekombinanten Enzymen mit einer nicht funktionellen Proteinkonformation, die durch fehlende oder nicht native Disulfidbrücken bedingt sein kann, verantwortlich.

Auch bei der Expression der beiden FMOs von *D. melanogaster* in *E. coli* wurden diese ebenfalls zu einem großen Anteil als Inclusion Bodies exprimiert (Scharf et al., 2004). Diese FMOs sind im Vergleich zur SNO von *T. jacobaeae* in den Kompartimenten Zytosol und Endoplasmatischem Retikulum (ER) lokalisiert. Die zytoplasmatische Form der FMO1 verfügt im Gegensatz zu der Form, die mit dem ER assoziiert ist, offenbar über umfangreiche posttranslationale Modifikationen (55 kDa-Form im Zytoplasma versus 49 kDa-Form in Mikrosomen), die möglicherweise essentiell für die Löslichkeit im Zytosol sind. Dies wird gestützt durch die schlechtere Löslichkeit der rekombinanten FMO1 von *D. melanogaster* im Vergleich zur FMO2, die sich trotz verschiedener Versuche im *E. coli*-System nicht steigern ließ. In Übereinstimmung hierzu entstanden bei der Expression der PNO sowohl von *G. geneura* (Kap. 3.6.1.1) als auch von *A. caca* (Kap. 3.6.1.2) in *E. coli* ausnahmslos Inclusion Bodies, die nur unter Schwierigkeiten in aktive Proteine zu renaturieren waren (Kap. 3.6.2). Die intrazelluläre Expression in *E. coli* ist deshalb für die FMOs der Insekten und im besonderen Maße für die PNOs nur bedingt geeignet. Im Gegensatz hierzu führte die Expression der SNO von *T. jacobaeae* im Insektenzellsystem zu einem rekombinanten Enzym, welches mutmaßlich über eine hohe spezifische Aktivität und eine gute Löslichkeit verfügte (Kap. 3.5.1). Bei der Expression im Insektenzellsystem erwies sich jedoch das Scaling-up sowohl mit den Baculoviren (Kap. 3.5.1) als auch im Konstitutivem System (Kap. 3.5.2) als limitierender Parameter, so dass die rekombinante SNO nur in einer nicht ausreichenden Menge zur Verfügung stand.

In beiden bislang verwendeten Expressionssystemen ließen sich keine ausreichenden Mengen bzw. Aktivitäten erzielen. Deshalb verbleibt die Aufgabe bestehen, rekombinante PNOs mit einer dem nativen Zustand äquivalenten Konformation bzw. Aktivität in ausreichender Menge zu erhalten. Für weitere Expressionen empfehlen sich zwei Möglichkeiten. Eine Perspektive bietet hier die Expression der Enzyme in *E. coli* mit prokaryontischen Signalsequenzen, die die exprimierten Enzyme in den periplasmatischen Raum dirigieren. Extrazelluläre Proteine der Prokaryonten verfügen häufig ebenfalls über Disulfidbrücken, und erhalten im eher oxidativem Milieu des periplasmatischen Raumes mit Unterstützung von dort lokalisierten Chaperonen ihre native Konformation. Da hierbei geeignete Chaperone zuvor nicht identifiziert werden können, sollten weitere Untersuchungen hierzu darauf abzielen geeignete Signalsequenzen zu identifizieren, die die exprimierten FMOs in den periplasmatischen Raum dirigieren. Nach Exkretion der rekombinanten FMOs könnten diese durch geeignete Chaperone in eine aktive Konformation überführt werden. Eine weitere erfolgversprechende Option bietet die Expression in eukaryontischen Systemen wie den Hefen, die neben einer mutmaßlich richtigen Verknüpfung der Disulfidbrücken auch äquivalente posttranslationale Modifikationen ausführen können. Im Vergleich zu der Expression im Insektenzellsystem mit Baculoviren werden in aller Regel höhere Ausbeuten erzielt.

### 4.2.3 Phylogenie der Flavin-abhängigen Monooxygenasen

Zu Beginn dieser Arbeit waren neben der SNO von *Tyria jacobaeae* jeweils zwei weitere cDNA-Sequenzen von FMOs aus *Drosophila melanogaster* bzw. *Anopheles gambiae* bekannt. Durch die identifizierten cDNA-Sequenzen der Flavin-abhängigen Monooxygenasen der Arctiiden (Kap. 3.3.3, ff.) wurde die Anzahl der bekannten FMOs der Insekten deutlich erweitert. Nach Datenbankvergleich (NCBI, Kap. 2.6.11) mit dem „basic local alignment search tool“ (BLAST) standen darüber hinaus weitere FMO-Sequenzen wie die von *Apis mellifera* für eine Computer gestützte Analyse zur Verfügung. Die cDNA der FMO von *Helicoverpa armigera* und von *Bombyx mori* wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Heckel zur Verfügung gestellt, so dass weitere Lepidopteren-FMOs in die Analyse einbezogen werden konnten. Um eine möglichst große Anzahl der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Sequenzen mit dem PROML-Algorithmus (Kap. 2.6.11) gemeinsam analysieren zu können, wurde von den für die Analyse ausgewählten FMO-Sequenzen (vgl. Abbildung 40) ein Teilbereich ausgewählt, der dem AS-Bereich der FMO1 bzw. FMO2 von *T. jacobaeae* (Kap. 3.3.10) entspricht.

Von den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten cDNA-Sequenzen weisen die potentiellen PNOs bzw. die PNO von *Grammia geneura* eine hohe Übereinstimmung zu der bereits gut charakterisierten SNO von *T. jacobaeae* auf. So konnte für die potentielle PNO von *A. caja* (Kap. 3.3.7) eine Identität von 76 % und für die PNO von *G. geneura* (Kap. 3.3.5) eine Identität von 75 % auf AS-Ebene ermittelt werden. Zueinander haben die PNO von *G. geneura* und die potentielle PNO von *A. caja* eine Identität von 86 %. Neben dem hohen Grad an Sequenz-Übereinstimmung zur SNO von *T. jacobaeae* konnte für die PNO von *G. geneura* die Identität der Sequenz als PNO auch durch Aktivität bestätigt werden (Kap. 3.6.2). Diese Übereinstimmungen spiegeln sich auch im Stammbaum wieder. So bilden die SNO-ähnlichen Sequenzen im Stammbaum eine klar abgegrenzte Gruppe (Abbildung 41). In diesem ist die doch relative Nähe von *A. caja* und *G. geneura* im Vergleich zu *T. jacobaeae* zu sehen. Dies steht in Übereinstimmung zu der bereits bekannt taxonomischen Bestimmung, in der innerhalb der Unterfamilie der Arctiinae die Gattung *Arctia* dem Tribus Arctiini und die Gattung *Tyria* dem Tribus Callimorphini zugeordnet wird (vgl. Weller et al., 1999). *G. geneura* steht als Teil des Tribus Arctiini der Gattung *Arctia* näher.

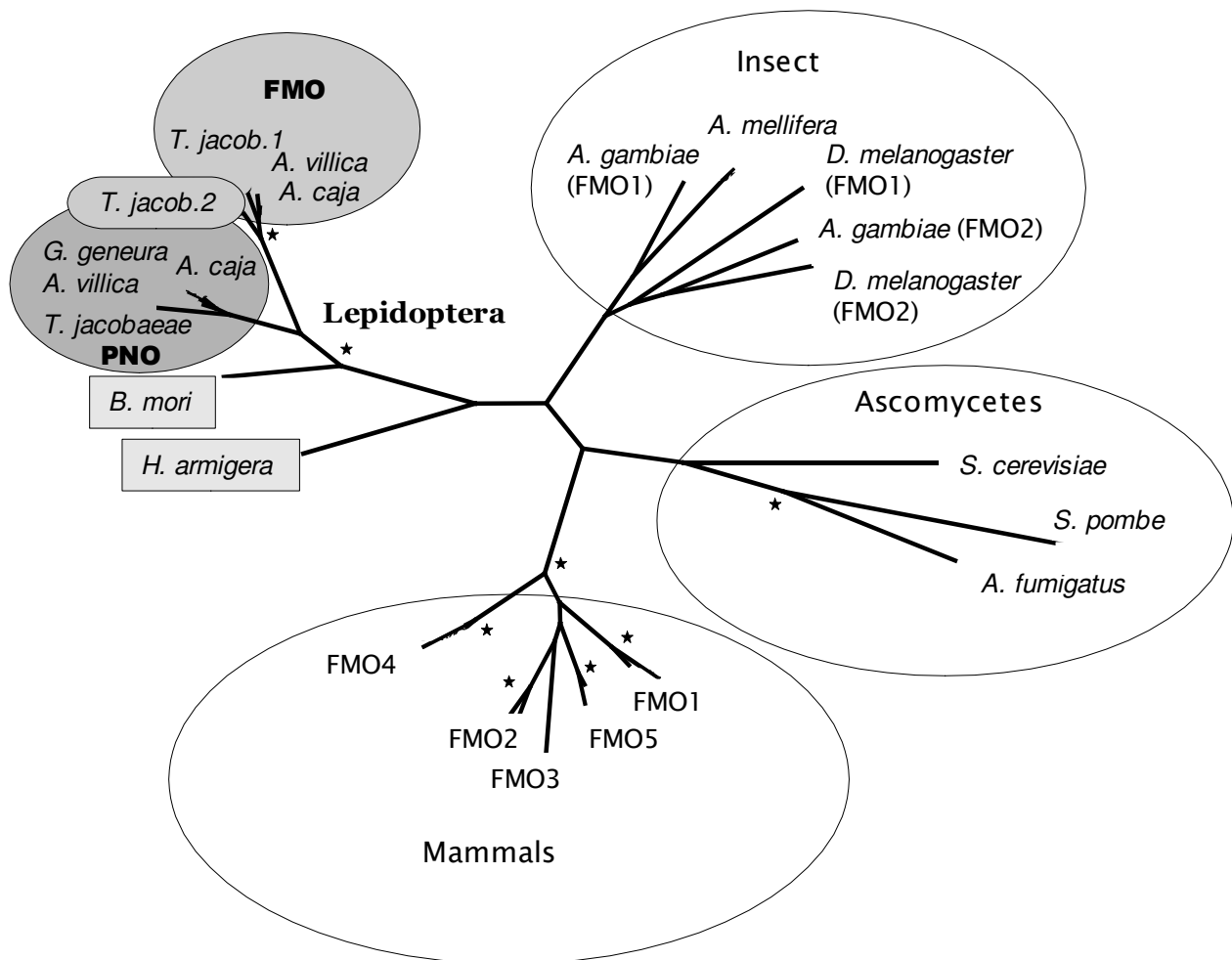
Die zweite Gruppe der neu-hinzugewonnenen Sequenzen der Arctiiden wird von den Sequenzen der beiden *Arctia*-Arten und den zwei Teil-Sequenzen von *T. jacobaeae* gebildet. Diese lassen sich aufgrund von Übereinstimmungen zu bereits bekannten FMOs, wie z. B. den Nukleotid-bindungsstellen, den FMOs zuordnen (Kap. 3.3.3 und 3.3.4). Die FMOs der beiden *Arctia*-Arten verfügen auf AS-Ebene zueinander über eine Identität von 92 %. Dies spiegelt das bereits bekannte enge Verwandtschaftsverhältnis wieder. Auch zu den beiden FMO-Teilsequenzen aus *T. jacobaeae* weisen die FMOs der *Arctia*-Arten eine hohe Übereinstimmung auf. So hat die Teilsequenz der FMO1 von *T. jacobaeae* eine Identität von 86 % und die Teilsequenz der FMO2 eine Identität von 89 % zur FMO von *A. caja* (vgl. Kap. 3.3.10). Aufgrund der unterschiedlichen Sequenzen, die in die Analyse einbezogen worden sind, lässt sich die Zugehörigkeit der Gattung *Arctia* bzw. *Tyria* zu unterschiedlichen Triben (Arctiini bzw. Callimorphini), wie sie sich bei den (potentiellen) PNOs abzeichnet, bei der FMO-Gruppe nicht erkennen.

Nach der vorliegenden phylogenetischen Analyse zeichnet sich ein etwas komplexeres Bild für die Insekten-FMOs. So zeichnen sich mehrere Sequenz-Gruppen innerhalb der Insekten ab. Die FMOs von *D. melanogaster*, *A. gambiae* und *A. mellifera* bilden eine eigene Gruppe von FMOs.



Erwartungsgemäß können die identifizierten Sequenzen der PNO von *G. geneura* und die der potentiellen PNOs von *A. caja* und *A. villica* mit der SNO von *T. jacobaeae* einer Gruppe zugeordnet werden (Abbildung 41). Von den mit dem PROML-Algorithmus ausgewerteten FMO-Sequenzen (Abbildung 40) weisen nur wenige eine größere Übereinstimmung zu den identifizierten Arctiiden-FMOs auf. So verfügt die bislang nicht näher charakterisierte FMO-Sequenz von *B. mori* über die relativ höchste Übereinstimmung zur SNO bzw. den PNOs. So besteht zu der SNO von *T. jacobaeae* eine Identität von 51 % und zur potentiellen PNO von *A. caja* eine Identität von 52 % auf AS-Ebene. Zur FMO von *A. caja* weist die FMO von *B. mori* eine Identität von 47 % auf. FMO-Sequenzen anderer Organismengruppen wie z. B. die der Ascomyceten sind von den identifizierten FMO-Sequenzen der Lepidopteren bzw. der Arctiiden eindeutig getrennt. Auch die FMOs der Säuger bilden eine von den übrigen FMOs klar abgegrenzte Gruppe, die sich in fünf Isoformengliedert.

	Art	Enzym	Acession Nr.	
Insekten	<i>Grammia geneura</i>	PNO	X	Kap. 3.3.5
	<i>Arctia caja</i>	Pot. PNO	X	Kap. 3.3.7
	<i>Arctia villica</i>	Pot. PNO	X	Kap. 3.3.8
	<i>Tyria jacobaeae</i>	SNO	CAD12369	
	<i>Arctia caja</i>	FMO	X	Kap. 3.3.3
	<i>Arctia villica</i>	FMO	X	Kap. 3.3.4
	<i>Tyria jacobaeae</i>	FMO1	X	Kap. 3.3.10
	<i>Tyria jacobaeae</i>	FMO2	X	Kap. 3.3.10
	<i>Helicoverpa armigera</i>	FMO	X	Q
	<i>Bombyx mori</i>	FMO	X	Q
	<i>Anopheles gambiae</i>	FMO	XP_311550	
	<i>Anopheles gambiae</i>	FMO	XP_311551	
	<i>Drosophila melanogaster</i>	FMO1	NP_611859	
	<i>Drosophila melanogaster</i>	FMO2	NP_610217	
	<i>Apis mellifera</i>	FMO	XP_394164	
Pilze	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FMO	NP_012046	
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	FMO	XP_748005	
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	FMO-ähnliche Sequenz	1VQW_A	
Säugetiere	<i>Homo sapiens</i>	FMO1	NP_002012	
	<i>Homo sapiens</i>	FMO2	Q99518	
	<i>Homo sapiens</i>	FMO3	BAD96886	
	<i>Homo sapiens</i>	FMO4	NP_002013	
	<i>Homo sapiens</i>	FMO5	CAA87633	
	<i>Mus musculus</i>	FMO1	NP_034361	
	<i>Mus musculus</i>	FMO2	AAD56413	
	<i>Mus musculus</i>	FMO4	AAI06859	
	<i>Mus musculus</i>	FMO5	P97872	
Q: Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Heckel Max-Planck-Institut f. Chemische Ökologie				
Abbildung 40: Quellennachweis der mit dem PHYLIP 3-68 Software-Paket analysierten FMO-Sequenzen. Die Sequenzen, die mit einer Zugangsnummer bezeichnet sind, wurden mit dem „basic local alignment tool“ (BLAST) des National Center for Biotechnology Information ermittelt (Kap. 2.6.11).				



10

Abbildung 41: Phylogenetische Analyse von Proteinsequenzen mit Homologien zu den Flavin-abhängigen Monooxygenasen der Arctiiden.

Für die Erstellung des Baumes wurden von den in Abbildung 40 aufgeführten Sequenzen der Teil der Proteinsequenzen extrahiert, der den internen Proteinsequenzen der beiden Teilsequenzen von *Tyria jacobaeae* entspricht (Kap. 3.3.10). So wurde von der Proteinsequenz von *G. geneura* die Teilsequenz von AS 64 – 234 (AS-Muster GGTW – SNVT, Abbildung 13) eingesetzt. Die Teilsequenzen wurden mit dem PROML-Algorithmus analysiert (PHYLP V 3.68 Software Paket, 2.6.11). Äste bzw. Gabelungen, deren Bootstrap-Werte größer oder gleich 0,9 sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die beiden Sequenz-Gruppen, die durch die identifizierten FMO-Sequenzen der Arctiiden gebildet werden, sind jeweils mit FMO bzw. PNO gekennzeichnet (fett). Die FMO-Teilsequenzen FMO1 und FMO2 von *T. jacobaeae* wurden zu *T. jacob.1* bzw. *T. jacob.2* abgekürzt.

Für den evolutionären Ursprung der SNO bzw. der (potentiellen) PNOs der Arctiiden stellt sich die Frage ob noch weitere FMOs bei den Arctiiden auffindbar sind und wie diese miteinander in Beziehung stehen. Für die schon zuvor postulierte Rekrutierung einer FMO (Naumann et al., 2002), die coevolutiv den Erfordernissen einer spezifischen Anpassung zur SNO bzw. PNO weiterentwickelt worden ist, konnte bislang die aus einer Genduplikation hervorgegangene FMO, wie dies im Falle der HSS und DHS gezeigt werden konnte (Ober et al., 2003), noch nicht identifiziert werden. Um zu prüfen ob z. B. die bei *A. caja* identifizierte FMO mit der potentiellen PNO in einem derartigen Kontext steht, ist die biochemische Charakterisierung beider Enzyme essentiell. Das bislang entstandene Bild der (potentiellen) PNOs bzw. das der FMOs der Arctiiden bedarf aber einer Erweiterung. In diesem Zusammenhang sind insbesondere die bereits untersuchten Arten auf weitere FMOs zu untersuchen. Darüber hinaus sind weitere *N*-Oxygenisierende Arctiiden bzw. Insekten zu untersuchen, die in einem weiteren Verwandtschaftsverhältnis zu den bislang untersuchten Arctiiden stehen.

### 4.3 Adaptionsmechanismen von Lepidopteren an pflanzliche Sekundärstoffe

Herbivoren wie die Lepidopteren nehmen mit ihrer pflanzlichen Nahrung eine Reihe von Substanzen sowohl des Primär- (z. B. Ligninbiosyntheseprodukte) als auch des Sekundärstoffwechsels (Alkaloide) auf, die für den Herbivoren keinen Nutzen haben oder sogar schädlich sind. Lepidopteren sind deshalb darauf angewiesen diese Substanzen rasch aus dem Körper auszuschleusen. Dies wird häufig durch effektive Exkretionsmechanismen erreicht, die aufgenommene Substanzen der Ausscheidung zuführen. Dieser Mechanismus schützt *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) vor einer Intoxikation mit Pyrrolizidinalkaloiden, die zwar resorbiert aber vor einer Bioaktivierung effektiv exkretiert werden (Lindigkeit, 1996). Exkretionsmechanismen beschränken sich bei den Lepidopteren jedoch nicht nur auf den Magen-Darm-Trakt, sondern können auch über spezielle Drüsen durch das Integument erfolgen. Dies ist für *Manduca sexta* eine wichtige Anpassung, um *Nicotiana*-Alkaloide (Nicotin) zu exkretieren (Kessler und Baldwin, 2002). Ein eher spezifischer Anpassungsmechanismus besteht in der Umgestaltung von Biomembranen neuronaler Zellen bei *M. sexta*, die das Nervensystem vor schädigenden Effekten der *Nicotiana*-Alkaloide schützt.

Für die Elimination pflanzlicher Substanzen, die in ihrer bestehenden Form nur schwer zu exkretieren oder toxisch sind, zeichnet sich bei den Lepidopteren ein von biochemischen Metabolisierungen geprägtes Bild. Bestehende Ergebnisse zeigen hierbei die zentrale Rolle der CYP450-Enzyme. Glucosinolate wie z. B. Glucobrassicin, die als pflanzliche Sekundärstoffe in den *Brassicaceae* verbreitet sind, führen über das Abbauprodukt Indol-3-carbinol bei *Helicoverpa zea* zu einer Induktion von verschiedenen Cytochrom P450-Enzymen (Li et al., 2002). Bei *Drosophila mettleri* konnten Cytochrom P450-Enzyme identifiziert werden, die essentiell für die Metabolisierung von Isochinolinalkaloiden und der sich daraus ergebenden Resistenz sind (Frank und Fogleman, 1992, Danielson et al., 1997). Auch für das Alkaloid Nicotin konnte in microsomalen Darmproben von *Manduca sexta* eine Induzierbarkeit und erhöhte enzymatische Aktivität von CYP450 -Enzymen durch die vorangegangene Fütterung von Nicotin belegt werden (Snyder et al., 1993).

Für die Funktion, die die in dieser Arbeit identifizierten Flavin-abhängigen Monooxygenasen im Umgang mit pflanzlichen (Sekundär-) Stoffen ausüben, sind bislang nur wenige Informationen

verfügbar. Dies ist zum Teil auf die doch quantitative Bedeutung der Cytochrom P450-Enzyme bei der Metabolisierung von pflanzlichen Stoffen bei Insekten zurückzuführen. So galten doch lange Zeit die Insekten als Organismen ohne Flavin-abhängige Monooxygenasen. Erst der Nachweis der ersten Insekten-FMO, die zudem noch über eine Funktion charakterisiert wurde, lenkte den Blick auf diese Enzymgruppe (Lindigkeit, 1996, Naumann et al., 2002). Retroperspektiv kommen für einige nicht geklärte Aktivitäten die Flavin-abhängigen Monooxygenasen in Betracht. So konnte z. B. in microsomalen Darmproben von *M. sexta* die *N*-Oxygenierung von Nicotin zu Nicotin-1-*N*-Oxid im Gegensatz zu den anderen Umsetzungen nicht durch typische Inhibitoren der CYP450-Enzyme unterbunden werden (Snyder et al., 1993). Andere Reaktionen in denen *N*-Oxide gebildet werden, wie bei der Metabolisierung von Phenanthroindolizidinalkaloiden von *Ideopsis similis* (Danaiidae), kommen aufgrund einer ähnlichen Struktur dieser Substrate durchaus Flavin-abhängige Monooxygenasen in Betracht (Abe et al., 2001).

Die Cytochrom P450-Enzyme sind bereits durch eine Reihe von biochemischen und molekularbiologischen Ergebnissen charakterisiert, die ihr komplexes aber auch gut aufeinander abgestimmtes Wirken bei der Metabolisierung von pflanzlichen Sekundärstoffen dokumentieren. So konnte an mehreren Beispielen eine differentielle Genexpression bzw. Aktivität der CYP450-Enzyme belegt werden. Nach Induktion mit Nicotin ließen sich bei *Manduca sexta* Änderungen der Aktivität mikrosomaler Enzyme des Darms, die durch typische CYP450-Inhibitoren signifikant gehemmt werden konnten, nachweisen (Snyder et al., 1993). Die Differenzierung der enzymatischen Aktivität besteht bei *M. sexta* jedoch noch aus einer offenbar gewebespezifischen Antwort. So konnten Aktivitäten bei der Metabolisierung von Nicotin bei Microsomenpräparationen von Darm und neuronalen Geweben nachgewiesen werden. Für den Fettkörper konnte jedoch eine Beteiligung an der Nicotin-Metabolisierung ausgeschlossen werden. Die differentielle Aktivität von CYP450-Enzymen nach Induktion mit verschiedensten pflanzlichen Sekundärstoffen ist besonders gut bei *Helicoverpa zea* dokumentiert (Li et al., 2002). So werden CYP-450 Enzyme bei *H. zea* gewebe- und geschlechterspezifisch transkribiert. Für CYP6B27, welches durch Xanthotoxin nicht jedoch durch Quercetin induziert werden kann, konnten als Transkriptionsorte Darm und in geringem Umfang Fettkörper und der Eierstock identifiziert werden. Hierzu im Gegensatz wird CYP6B9 nur im Darm transkribiert. Es besteht für CYP6B27 aber auch eine geschlechterspezifische Transkription. So konnte in adulten Weibchen nicht aber bei Männchen eine Transkription nachgewiesen werden, die mutmaßlich in transkriptionsaktiven Geweben des Eierstocks erfolgen.

Als einzige bislang bekannte FMO, die die enzymatische Umsetzung von PAs katalysiert, ist die Senecionin *N*-Oxygenase von *T. jacobaeae* essentiell für die Metabolisierung dieser pflanzlichen Sekundärstoffe (Lindigkeit et. al., 1997, Naumann, et al. 2002). Die SNO bzw. die (potentiellen) PNOs sind in diesem Zusammenhang aber möglicherweise nur Vertreter einer Gruppe von potentiell zwei FMO-Gruppen, die als Ergänzung der CYP450-Enzyme wichtige Funktionen in der Xenobiotika-Metabolisierung von Arctiiden ausüben. So weisen auch alle bislang identifizierten FMOs der Arctiiden eine N-terminale Sequenz auf, die als Signalsequenzen für den vesikulären Transport vorhergesagt worden sind (Kap. 3.3.3, Kap. 3.3.4). Als lösliche Enzyme der Hämolymphe könnten sie wie die SNO Xenobiotika schneller als mikrosomale Fettkörper-Enzyme umsetzen. Dies steht in Analogie zu den enzymatischen Aktivitäten, die für Nicotin im Darm und in neuronalen Geweben von *Manduca sexta* gemessen werden konnten (Snyder et al., 1993). Hierbei sind die Expressionorte Darm bei *Manduca sexta* und die Ausschleusung der SNO bzw. der PNOs in die Hämolymphe der Arctiiden für eine rasche Umsetzung der aufgenommenen Xenobiotika erforderlich. Ergänzend hierzu könnte die Transkription bzw. Expression der potentiellen PNO von *A. caja* in neuronalen bzw. Kopfgeweben eine Schutzfunktion für das Nervengewebe sein, durch

die tertiäre PAs, die bereits im Kopfsegment bei der Nahrungsaufnahme aufgenommen werden, möglichst schnell in das *N*-Oxid umgewandelt werden.

Die Entwicklung eines Enzyms, welches an die Entgiftung einer spezifischen Stoffgruppe angepasst ist, setzt eine Vielzahl von Anpassungen voraus, durch die Aktivität und Expression reguliert werden. So ist die Etablierung eines Enzyms auch an die Entwicklung von Regulationsmechanismen geknüpft, die mit dem Enzym zu einer funktionellen Einheit zugefügt werden müssen. Der hierfür wahrscheinlichste Mechanismus ist die Rekrutierung eines durch Genduplikation entstandenen zweiten Gens, so dass bereits bestehende Regulationsmechanismen des Ursprungsgens verwendet werden können. Dies konnte bereits im Pflanzenreich für eine Reihe von Beispielen gezeigt werden (Ober und Hartmann, 1999; Ober et al., 2003). Die SNO von *T. jacobaeae* (Naumann et al. 2002), die (potentiellen) PNOs der Arctiiden (Kap. 3.3.5, 3.6.1.2, 3.3.8) und die FMOs (Kap. 3.3.3, 3.3.4) lassen sich aufgrund der Sequenzidentitäten in zwei Gruppen einteilen (Kap. 4.2.3). Die Entstehung dieser beiden Gruppen könnte ebenfalls direkt auf eine Genduplikation zurückzuführen sein.

## 5 Ausblick

Die Familie der Arctiiden kann noch einmal in drei Unterfamilien gegliedert werden, von denen bislang nur in der Unterfamilie der Arctiinae bei einer Reihe von Arten die Nutzung von PAs nachgewiesen werden konnten (Weller et al., 1999). Im Gegensatz hierzu konnten jedoch in den Unterfamilien Syntominiæ und Lithosiinae andere Substanzen nachgewiesen werden, für die eine wichtige Funktion in der Abwehr von Fraßfeinden angenommen wird. So wurden in der Unterfamilie der Lithosiinae z. B. bei *Eilema complana* Inhaltsstoffe aus Flechten nachgewiesen (Übersicht, Weller et al., 1999). Für die Anpassung bzw. Nutzung von PAs wurde deshalb postuliert, dass die Fähigkeit der Arctiiden, die der Unterfamilie der Arctiinae angehören, PAs zu speichern, erst nach Trennung von den Lithosiinae bzw. den Syntominiæ entwickelt worden ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch im Qualitativen Aktivitätstest bei einem Teil der Individuen von *Eilema albicosta* eine enzymatische *N*-Oxygenierung tertiärer PAs nachgewiesen werden (Kap. 3.1.2). Ob für die *N*-Oxygenierung tertiärer PAs in Arten wie *E. albicosta* eine potentielle PNO verantwortlich ist, muss erst noch in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Zur Aufklärung des evolutionären Ursprungs der SNO bzw. der PNOs ist die Identifizierung weiterer Sequenzen innerhalb der Arctiinae und ggf. innerhalb der anderen Unterfamilien erforderlich.

Bei den Lepidopteren sind bereits seit einiger Zeit andere *N*-oxygenierende Vertreter der Familie Nymphalidae in den Unterfamilien Danaidae und Ithomiinae bekannt (Brückmann et al., 2000). Auch bei diesen angepassten Lepidopteren erscheint es wahrscheinlich, dass die Fähigkeit die tertiären Pyrrolizidinalkaloide in das korrespondierende *N*-Oxid zu überführen durch eine PNO vermittelt wird. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage ob die SNO bzw. die PNOs mono- oder polyphyletischen Ursprungs innerhalb der Lepidopteren sind. Darüber hinaus sind andere *N*-Oxygenierende Insekten wie *Zonocerus variegatus* (Orthoptera, Pyrgomorphidae) in die Untersuchungen einzubinden. Die Entwicklung eines derartig spezifischen Enzyms, welches ein komplexes System der verschiedensten Anpassungen zur Nutzung der Pyrrolizidinalkaloide ermöglicht hat, erscheint am besten erklärbar durch eine Rekrutierung eines bestehenden Enzyms. Voraussetzung hierfür ist jedoch eine Genduplikation. Dies ist umso wahrscheinlicher als nicht nur ein Enzym, welches in einen physiologischen Zusammenhang eingebunden ist, eine Adaption der Substratspezifität benötigt, die zu Lasten der originären Funktion führen muss, sondern auch für die Funktion spezifische Regulationsmechanismen erforderlich sind. Die zeitgleiche, vollständige

Entwicklung eines Enzyms und der erforderlichen Regulationsmechanismen erscheint in diesem Zusammenhang weniger wahrscheinlich. Erst die Regulationsmechanismen ermöglichen eine gezielte Nutzung eines hierfür „abgestellten“ Enzyms. Von den Mechanismen, die die Regulation eines derartigen Enzyms ausüben, darf erwartet werden, dass sie trotz einiger Anpassungen ein hohes Maß an Konservierung auch nach der Genduplikation erfahren haben. Die Aufklärung und molekularbiologische Analyse dieser Mechanismen könnte somit wichtige Beweise für die evolutionäre Abstammung der SNO bzw. der PNOs liefern.

Erste Ergebnisse bei *E. albicosta* (Lithosiinae) deuten auf die Induzierbarkeit der enzymatischen Aktivität, die tertiäre PAs in das korrespondierende *N*-Oxid überführen, hin (Kap. 3.1.2). Auch bei der potentiellen PNO von *Arctia caja* (Arctiinae) deuten vorliegenden Ergebnisse der RT-PCR auf eine mögliche Induzierbarkeit hin (Kap. 3.7). Diese möglicherweise bedarfsorientierte Expression der potentiellen PNO könnte für Generalisten, die keine erreichbare PA-Quelle haben, eine ressourcensparende Anpassung sein. Die Hinweise hinsichtlich einer möglichen Induktion der Expression der potentiellen PNO der o. g. Arten müssen jedoch noch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Da die Pyrrolizidinalkaloide eine effektive chemische Abwehr sind, entsteht ohne sie eine verminderte oder fehlende Verteidigung für die Arctiiden. Ob und wie eine zusätzliche chemische Abwehr die Lücke zu schließen vermag, ist bislang ungeklärt.

Die in dieser Arbeit bei den Arten *A. caja* und *A. villica* identifizierten Flavin-abhängigen Monooxygenasen (Kap. 3.3.3 und 3.3.4), die nicht den potentiellen PNOs zuzurechnen sind, haben das Spektrum der für die Metabolisierung von Xenobiotika in Frage kommenden Enzyme der Lepidopteren erweitert. Doch bislang verbleibt die Funktion dieser FMO-Gruppe unbekannt. Für ein besseres Verständnis aller FMOs ist die biochemische Charakterisierung der identifizierten Arctiiden-FMOs essentiell und eine noch nicht befriedigend gelöste Aufgabe. Hierfür ist die Expression aktiver, rekombinanter Enzyme erforderlich, mit der auch für die PNOs wichtige Ergebnisse zu erwarten sind. So liegen Pyrrolizidinalkaloide, die nicht die für eine Toxizität erforderlichen Strukturmerkmale aufweisen, offenbar auch in ihrer *N*-Oxid-Form in einigen Arctiiden vor. Vorherige Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Aktivität der SNO des Spezialisten *T. jacobaeae* an spezifische Strukturmerkmale geknüpft ist. Die molekularbiologische Isolierung und biochemische Charakterisierung gerade auch solcher PNOs können das Verständnis der Funktion und coevolutiven Adaption der PNOs erweitern. Auch für die Metabolisierung anderer Alkaloide wie den Phenanthroindolizidinalkaloiden könnten die Flavin-abhängigen Monooxygenasen verantwortlich sein, die mutmaßlich bei *Ideopsis similis* die Bildung der korrespondierenden *N*-Oxide vollziehen könnten (Abe et al., 2001).

## 6 Zusammenfassung

- I. Vor der molekularbiologischen Bearbeitung verschiedener Arctiiden konnte für die Arten *Arctia villica*, *Eilema albicosta* und *Pericallia matronula* in Hämolympheproben die enzymatische Umsetzung von tertiären Pyrrolizidinalkaloiden in das korrespondierende *N*-Oxid belegt werden.
- II. Durch Vergleiche von bekannten Flavin-abhängigen Monooxygenasen konnten degenerierte Primer konstruiert werden, die zur Amplifizierung von bisher unbekannten FMOs in den Arctiiden führten. Diese konnten erfolgreich für die Weiterentwicklung von degenerierten Primern verwendet werden, die über einen geringeren Grad an Degeneriertheit verfügen. Darüber hinaus konnten trotz der Degeneriertheit Primer konstruiert werden, die eine verbesserte Spezifität für eine PNO oder eine der isolierten FMOs in den Arctiiden aufweisen. Somit stehen nun eine Reihe von Primern zur Verfügung, die die molekularbiologische Identifizierung von Flavin-abhängigen Monooxygenasen in Arctiiden verbessern.
- III. Durch den Einsatz von degenerierten Primern konnten aus dem Fettkörper von *A. caja* und *A. villica* erstmalig bislang unbekannte Flavin-abhängige Monooxygenasen isoliert und identifiziert werden. Nach Sequenzanalyse konnten Sequenz-Motive, wie sie für die Flavin-abhängigen Monooxygenasen der Insekten charakteristisch sind, bestätigt werden. Wie auch für die SNO von *T. jacobaeae*, konnte auch bei diesen FMOs eine N-terminale Signalsequenz vorhergesagt werden, die diese Enzyme ebenfalls für den vesikulären Transport adressiert.
- IV. Auch die ursprüngliche Zielsetzung auf molekularbiologischem Wege Pyrrolizidinalkaloid *N*-Oxygenasen zu identifizieren konnte erreicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere (Teil-) Sequenzen der (potentiellen) PNOs aus verschiedenen Arten identifiziert werden. Somit konnte die Grundlage für weiterführende molekularbiologische Untersuchungen der Pyrrolizidinalkaloid *N*-Oxygenasen gelegt werden.
- V. Die Senecionin *N*-Oxygenase von *T. jacobaeae* konnte mit dem Insektenzellsystem exprimiert und mit einer Affinitätschromatographie einfach gereinigt werden. Durch den Nachweis der enzymatischen Umsetzung von Pyrrolizidinalkaloiden konnte die Identität der Sequenz auf biochemischem Wege bestätigt werden.
- VI. Von den neu-hinzugewonnenen potentiellen PNOs konnte die von *Grammia geneura* in *E. coli* in Form von Inclusion bodies exprimiert werden. Die isolierten Inclusion bodies konnten nach mehreren Faltungsprotokollen in einer aktiven Form erhalten werden. Somit wurde auf biochemischen Wege bestätigt, dass die bei *G. geneura* identifizierte Sequenz die gesuchte PNO ist.

- VII. Mit der RT-PCR konnten in Raupen von *Arctia caja*, die sich im letzten Entwicklungsstadium vor der Verpuppung befanden, die gewebespezifischen Transkriptionsorte für die potentielle PNO identifiziert werden. Hierbei wurde der Fettkörper als ein Ort der Transkription in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von *T. jacobaeae* bestimmt. Darüber hinaus konnte der Kopf der Raupen als ein zusätzlicher Ort der Transkription der potentiellen PNO von *Arctia caja* identifiziert werden.
- VIII. Für eine mutmaßliche Induzierbarkeit der PNO konnten bei unterschiedlichen Individuen von *Eilema albicosta* erste Hinweise durch Aktivitätsteste mit der Hämolymphe erbracht werden. In Übereinstimmung hierzu gelang die Amplifikation von Teilsequenzen der potentiellen PNO in der RT-PCR bei *Arctia caja* nur bei cDNA-Proben, die aus Tieren stammten, die zuvor mit PAs gefüttert wurden.



## 7 Literaturverzeichnis

- Abe, F., Yamauchi, T., Honda, K., Omura, H., Hayashi, N. (2001). Sequestration of phenanthroindolizidine alkaloids by an asclepiadaceae-feeding danaid butterfly, *Ideopsis similis*. *Phytochemistry* 56, 697-701.
- Agosin, M., Ankley, G. T. (1987). Conversion of *N,N*-dimethylaniline to *N,N*-dimethylaniline-*N*-oxide by a cytosolic flavin-containing enzyme from *Trypanosoma cruzi*. *Drug Metabolism and Disposition* 15, 2, 200 – 203.
- Anke, S., Gonde, D., Kaltenegger, E., Hänsch, R., Theuring, C., Ober, D. (2008). Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in phalaenopsis orchids: Developmental expression of alkaloid-specific homospermidine synthase in root tips and young flowers buds. *Plant Physiology* 148, 751 – 760.
- Anke, S., Niemüller, D., Moll, S., Hänsch, R., Ober, D. (2004). Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. *Plant Physiology* 136, 4037 – 4047.
- Bergé, J.-B., Feyereisen, R., Amichot, M. (1998). Cytochrome P-450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 353, 1701 – 1705.
- Bernays, E. A., Chapman, R. F., Hartmann, T. (2002a). A highly sensitive taste receptor cell for pyrrolizidine alkaloids in the lateral galeal sensillum of a polyphagous caterpillar, *Estigmene acrea*. *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, 188, 715 – 723.
- Bernays, E. A., Chapman, R. F., Hartmann, T. (2002b). A taste receptor neurone dedicated to the perception of pyrrolizidine alkaloids in the medial galeal sensillum of two polyphagous arctiid caterpillars. *Physiological Entomology*, 27, 312 -321.
- Bezzarides, A., Yong, T.-H., Bezzarides, J., Hussein, J., Ladau, J., Eisner, M., Eisner, T. (2004). Plant-derived pyrrolizidine alkaloid protects eggs of a moth (*Utetheisa ornatrix*) against a parasitoid wasp (*Trichogramma ostrinae*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 24, 9029 – 9032.
- Biller, A. (1993). Metabolisierung und Speicherung pflanzlicher Pyrrolizidinalkaloide durch adaptierte und nicht adaptierte Insekten. Dissertation TU Braunschweig.
- Bowers, M. D., Stamp, N. E. (1997). Fate of host-plant iridoid glycosides in lepidopteran larvae of nymphalidae and arctiidae. *Journal of Chemical Ecology* 23, 12, 2955-2964.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248 – 254.
- Brückmann, M., Trigo, J. R., Foglio, M. A., Hartmann, T. (2000). Storage and metabolism of radioactively labeled pyrrolizidine alkaloids by butterflies and larvae of *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae, Ithomiinae). *Chemoecology* 10, 25 – 32.
- Cashman, J. R. (1995). Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chemical Research in Toxicology* 8, 2, 165-181.

- Caspers, P., Stieger, M., Burn, P. (1994). Overproduction of bacterial chaperones improves the solubility of recombinant protein tyrosine kinases in *E. coli*. Cellular and Molecular Biology 40 (5), 635 – 644.
- Chang, A., Hartmann, T. (1998). Solubilization and characterization of a senecionine *N*-oxygenase from *Crotalaria scassellatii* seedlings. Phytochemistry 49, 7, 1859 – 1866.
- Conner, W. E., Boada, R., Schroeder, F. C., Gonzalez, A., Meinwald, J., Eisner, T. (2000). Chemical defense: Bestowal of a nuptial alkaloidal garment by a male moth on its mate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97, 26, 14406 – 14411.
- Dalbey, R., E., v. Heijne, G. (2002). Protein Targeting Transport & Translocation. Academic Press.
- Danielson, P. B., MacIntyre, R. J., Fogleman, J. C. (1997). Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome P450s: Evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 94, 10797 – 10802.
- El-Alfy, A. T., Schlenk, D. (2002). Effect of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone on the expression of flavin-containing monooxygenase and the toxicity of aldicarb to japanese medaka, *Oryzias latipes*. Toxicological Sciences 68, 381 – 388.
- Frank, M. R., Fogleman, J. C. (1992). Involvement of cytochrome P450 in host-plant utilization by sonoran desert *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 11998 – 12002.
- Freitas, A. V. I., Trigo, J. R., Brown, K. S., Witte, L., Hartmann, T., Barata, L. E. S. 1996. Tropane and pyrrolizidine alkaloids in the itomiines *Placidula euryanassa* and *Miraleria cymothoe* (Lepidoptera: Nymphalidae). Chemoecology 7, 61-67.
- Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G., Chou, M. W. (2002). Genotoxic pyrrolizidine alkaloids – mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. International Journal of Molecular Sciences 3, 948 – 964.
- Gaertner, L. S., Murray, C. L., Morris, C. E. (1998). Transepithelial transport of nicotine and vinblasine in isolated malpighian tubules of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) suggests a P-glycoprotein-like mechanism. The Journal of Experimental Biology 201, 2637 – 2645.
- Halitschke, R., Schittko, U., Pohnert, G., Boland, W., Baldwin, I. T. (2001). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. Plant Physiology 125, 711 – 717.
- Hartmann, T. (1999). Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. Planta 207, 483 – 495.
- Hartmann, T. (2004a). Plant derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. Planta 219, 1 – 4.
- Hartmann, T., Ober, D. (2000). Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. Topics in Current Chemistry 209, 207 -243.

- Hartmann, T., Theuring, C., Beuerle, L. E., Singer, M. S., Bernays, E. A. (2004c). Acquired and partially de novo synthesized pyrrolizidine alkaloids in two polyphagous arctiids and the alkaloid profiles of their larval food-plants. *Journal of Chemical Ecology* 30, 229 – 254.
- Hartmann, T., Theuring, C., Beuerle, T., Bernays, E. A. (2004b). Phenological fate of plant-acquired pyrrolizidin alkaloids in the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Chemoecology* 14, 207 – 216.
- Hartmann, T., Theuring, C., Beuerle, T., Bernays, E. A., Singer, M. S. (2005). Acquisition, transformation and maintenance of plant pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Grammia geneura*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 1083-1099.
- Hartmann, T., Theuring, C., Schmidt, J., Rahier, M., Pasteels, J. M. (1999). Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. *Journal of Insect Physiology* 45, 1085 – 1095.
- Hartmann, T., Theuring, C., Witte, L., Schulz, S., Pasteels, J. M. (2003). Biochemical processing of plant acquired pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 515 – 523.
- Hartmann, T., Witte, L. (1995). Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. In: *Alkaloids: Chemical and biological perspectives*. Pelletier, S. W., ed (Oxford: Pergamon), 155 – 233.
- Hartmann, T., Zimmer, M. (1986). Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *senecio* species. *Journal of Plant Physiology*, 122, 67 – 80.
- Hines, R. N., Hopp, K. A., Franco, J., Saeian, K., Begun, F. P. (2002). Alternative processing of the human FMO6 gene renders transcripts incapable of encoding a functional flavin-containing monooxygenase. *Molecular Pharmacology* 62, 320 – 325.
- Hristov, N., Conner, W. E. (2005). Effectiveness of tiger moth (Lepidoptera, Arctiidae) chemical defenses against an insectivorous bat (*Eptesicus fuscus*). *Chemoecology* 15, 105 – 113.
- Katchamart, S., Stresser, D. M., Dehal, S. S., Kupfer, D., Williams, D. E. (2000). Concurrent flavin-containing monooxygenase down-regulation and cytochrome P-450 induction by dietary indoles in rat: Implications for drug-drug interaction. *Drug metabolism and disposition* 28, 8, 930-936.
- Kessler, A., Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* 53, 299 – 328.
- King, L. A., Possee, R. D. (1992). *The baculovirus expression system: a laboratory guide* Chapman & Hall.
- Krause, R. J., Lash, L. H., Efarra, A. A. (2003). Human kidney flavin-containing monooxygenases and their potential roles in cysteine S-conjugate metabolism and nephrotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 304, 1, 185 -191.
- Lang, D. H., Yeung, C. K., Peter, R. M., Ibarra, C., Gasser, R., Itagaki, K., Philpot, R. M., Rettie, A. E. (1998). Isoform specificity of trimethylamin N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450-Enzymes: Selective catalysis by FMO3. *Biochem. Pharmacol* 56, 1005 – 1012.

- Lange, C., Rudolph, R. (2004). Production of recombinant proteins for therapy, diagnostics, and industrial research by in vitro folding. Protein Folding Handbook. Part II, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 1215 – 1250.
- Lawton, M. P., Philpot, R. M. (1993). Functional characterization of flavin-containing monooxygenase 1B1 expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* and analysis of proposed FAD- and membrane-binding domains. The Journal of Biological Chemistry 268, 8, 5728 – 5734.
- Lawton, M. P., Philpot, R. M. (1993). Molecular genetics of the flavin-dependent monooxygenases. Pharmacogenetics 3, 40 – 44.
- Li, W., Schuler, M. A., Berenbaum, M. R. (2003). Diversification of furanocoumarin-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases in two papilionids: Specificity and substrate encounter rate. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 2, 14593 – 14598.
- Li, X., Baudry, J., Berenbaum, M. R., Schuler, M. A. (2004). Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: From specialist to generalist cytochrome P450. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, No. 9, 2939 – 2944.
- Li, X., Berenbaum, M. R., Schuler, M. A. (2002). Plant allelochemicals differentially regulate *Helicoverpa zea* cytochrome P450 genes. Insect Molecular Biology 11 (4), 343 – 351.
- Lilie, H., Schwarz, E., Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. Current Opinion in Biotechnology 9, 497 – 501.
- Lindigkeit, R., Biller, A., Buch, M., Schiebel, H-M., Boppré, M., Hartmann, T. (1997). The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its *N*-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. European Journal of Biochemistry 245, 626 – 636.
- Lindigkeit, R. (1996). Pyrrolizidinalkaloid-speichernde Insekten: Mechanismen der Alkaloidresorption und Charakterisierung einer spezifischen Pyrrolizidinalkaloid-*N*-Oxygenase. (Dissertation, TU Braunschweig).
- Lua, L. H. L., Reid, S. (2003). Effect of time of harvest of budded virus on the selection of baculovirus FB mutants in cell culture. Biotechnol. Prog. 19, 238 – 242.
- Mattocks, A. R. (1986). Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. London, New York: Academic press.
- Mayer, M. P., Brehmer, D., Gässler, C. S., Bukau, B. (2002). Hsp70 chaperone machines. Advances in Protein Chemistry 59, 1-43.
- Miranda, C. L., Reed, R. L., Guengerich, F. P., Buhler, D. R. (1991). Role of cytochrome P450 IIIA4 in the metabolism of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in human liver. Carcinogenesis 12, 3, 515 – 519.
- Moll, S., Anke, S., Kahmann, U., Hänsch, R., Hartmann, T., Ober, D. (2002). Cell-specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidine alkaloid pathway in *senecio vernalis*, in comparison with its ancestor, deoxyhypusine synthase.
- Naberhaus, I., Zintgraf, V., Dobler, S. (2005). Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels – evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. Chemoecology 15, 121 – 125.

- Naumann, C. (2003). Klonierung und Expression einer für die Detoxifizierung von Pyrrolizidinalkaloiden verantwortlichen Flavin-abhängigen Monooxygenase aus *Tyria jacobaeae*. (Dissertation, TU Braunschweig).
- Naumann, C., Hartmann, T., Ober, D. (2002). Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 9, 6085-6090.
- Newton, C. R., Graham, A. (1994). PCR. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage, 61.
- Nickisch-Rosenegk, E. von, Wink, M. (1993). Sequestration of pyrrolizidine alkaloids in several arctiid moths (Lepidoptera: Arctiidae). Journal of Chemical Ecology 19, 9 1889 -1903.
- Nurhayati, N. (2004). Identification, molecular cloning and characterisation of homospermidine synthase and deoxyhypusine synthase from phalaenopsis and crotalaria Species. Dissertation TU Braunschweig, S. 130 – 139.
- Ober, D., Harms, R., Witte, L., Hartmann, T. (2003). Molecular evolution by change of function. Alkaloid-specific homospermidine synthase retained all properties of deoxyhypusine synthase except binding the eIF5A precursor protein. The Journal of Biological Chemistry, 278, 15, 12805-12812.
- Ober, D., Hartmann, T. (1999). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 26, 14777 – 14782.
- Ober, D. (2005). Seeing double: gene duplication and diverification in plant secondary metabolism. Trends in Plant Science 10, 9, 444 – 449.
- Ober, D.. Chemical Ecology Of Alkaloids Exemplified With The Pyrrolizidines. 203 -230.
- Orr, A. G., Trigo, J. R., Witte, L., Hartmann, T. (1996). Sequestration of pyrrolizidine alkaloids by larvae of *Tellervo zoilus* (Lepidoptera: Ithomiinae) and their role in the chemical protection of adults against the spider *Nephila maculata* (Araneidae). Chemoecology 7, 68 – 73.
- Rehm, H. (2000). Der Experimentator: Proteinbiochemie – Proteomics. 3. Aufl.
- Reimann, A., Nurhayati, N., Backenköhler, A., Ober, D. (2004). Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. The Plant Cell, 16, 2772 – 2784.
- Roque-Albelo, L., Schroeder, F. C., Conner, W. E., Bezzerides, A., Hoebeke, E. R., Meinwald, J., Eisner, T.. (2002). Chemical defense and aposematism: the case of *Utetheisa galapagensis*. Chemoecology, 12, 153 - 157.
- Saibil, H. R., Horwich, A. L., Fenton, W. A. (2002). Allostery and protein substrate conformational change during GroEL/GroES-mediated protein folding. Advances in Protein Chemistry 59, 45-72.
- Scharf, M., E., Scharf, D. W., Bennett, G. W., Pittendrigh, B. R. (2004). Catalytic activity and expression of two flavin-containing monooxygenases from *Drosophila melanogaster*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 57, 28 – 39.

- Schlenk, D., Buhler, D. R. (1991). Flavin-containing monooxygenase activity in liver microsomes from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 20, 13 – 24.
- Schuler, M. A. (1996). The Role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. *Plant Physiology* 112: 1411 – 1419.
- Singer, M. S., Carrière, Y., Theuring, C., Hartmann, T. (2004). Notes und comments. Disentangling food quality from resistance against parasitoids: Diet choice by a generalist caterpillar. *The American Naturalist* 164, no. 3.
- Snyder, M. J., Hsu, E.-L., Feyereisen. (1993). Induction of cytochrome P-450 activities by nicotine in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Chemical Ecology* 19, 12, 2903-2916.
- Stewart, M. J., Steenkamp, V. (2001). Pyrrolizidine poisoning: A neglected area in human toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring* 23, 698 – 708.
- Suh, J-K., Poulsen, L. L., Ziegler, D. M., Robertus, J. D. (1996). Molecular cloning and kinetic characterization of a flavin-containing monooxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 336, 2, 268 – 274, Article No. 0557.
- Suh, J-K., Poulsen, L. L., Ziegler, D. M., Robertus, J. D. (1999a). Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 96, 2687 – 2691.
- Suh, J-K., Poulsen, L. L., Ziegler, D. M., Robertus, J. D. (1999b). Lysine 219 participates in NADPH specificity in a flavin-containing monooxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 372, No. 2, 360 – 366.
- Suh, J-K., Poulsen, L. L., Ziegler, D. M., Robertus, J. D. (2000b). Redox regulation of yeast flavin-containing monooxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 381, No. 2, 317 – 322.
- Suh, J-K., Robertus, J. D. (2000a). Yeast flavin-containing monooxygenase is induced by the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 97, No. 1, 121-126.
- Theißen, G. (2002). Secret life of genes. *Nature* 415, 741.
- Trigo, J. R., Brown J. R., Witte, L., K. S., Hartmann, T., Ernst, L., Barata, L. E. S. (1996). Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 4, 669-679.
- Vannelli, T. A., Dykman, A., de Montellano, P. R. O. (2002). The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 277, 15, 12824 – 12829.
- Weller, S. J., Jacobson, N. L., Conner, W. E. (1999). The evolution of chemical defences and mating systems in tiger moths (Lepidoptera: Arctiidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 68, 557 – 578.
- Winz, R. A., Baldwin, I. T. (2001). Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. IV. Insect-induced ethylene reduces jasmonate-induced nicotine accumulation by regulating putrescine N-methyltransferase transcripts. *Plant Physiology*, 125, 2189 – 2202.

- Witte, L., Ehmke, A., Hartmann, T. (1990). Interspecific flow of pyrrolizidine alkaloids. From plants via aphids to ladybirds. *Naturwissenschaften* 77, 540 – 543.
- Zhang, M., Robertus, J. D. (2002). Molecular cloning and characterization of a full-length flavin-dependent monooxygenase from yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 403, 277 – 283.
- Ziegler, D. M. (1993). Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 33, 179 – 199.